

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Entwicklung und Standardisierung eines neuen und schnellen Assays für TSH-  
Rezeptor-stimulierende Immunglobuline (TSI)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Marie Beatrice Nitsch  
aus Mainz

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

12.07.2022

In Liebe meiner mich in allen Lebenslagen unterstützenden Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>16</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>18</b>
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>20</b>
2.1 Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen.....	20
2.2 Historie: Bindungs-Immunoassays zur Detektion der Antikörperbindung.....	22
2.3 Historie: Bioassays zur Bestimmung der funktionalen Antikörperaktivität .....	22
2.3.1 <i>In vivo</i> -Assays.....	23
2.3.2 Zellbasierte Assays mit endogener TSH-Rezeptor-Expression .....	24
2.3.3 Zellbasierte Assays mit rekombinanter TSH-Rezeptor-Expression.....	25
2.3.4 Entwicklung von TBI-Assays.....	28
2.3.5 Zusammenfassung .....	28
2.4 Aktuelle Messmethoden .....	29
2.5 Das GloSensor™-22F cAMP Plasmid.....	31
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>33</b>
3.1 Material .....	33
3.2 Methoden .....	36
3.2.1 Funktionsweise des GloSensor™ cAMP-Assays .....	36
3.2.2 Optimierungsschritte .....	36
3.2.2.1 Allgemeine Protokollmodifikation.....	36
3.2.2.2 Zellpräparation .....	40
3.2.2.3 Verwendung von 96-well-Platten.....	40
3.2.2.4 Zellwachstumszeit .....	41
3.2.2.5 Probenvolumen/Suspensionsvolumen .....	41
3.2.2.6 Inkubationszeit und -bedingungen.....	41

3.2.2.7 Plattenmesszeitpunkte .....	42
3.2.2.8 Kontrollen und Standards .....	42
3.2.3 Auswertung der Lichtsignale .....	43
3.2.4 Stimulation mit monoklonalen Antikörpern: M22, K1-70.....	44
3.2.4.1 Testung von M22 in verschiedenen Verdünnungsmedien: RB vs. NS .....	44
3.2.4.2 Blockade der stimulierenden Aktivität von M22 durch K1-70....	44
3.2.4.3 Testung von M22 mit verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen.....	47
3.2.5. Stimulation mit Patientenseren und euthyreoten Kontrollen .....	48
3.2.5.1 Patientenkollektiv und Auswahl der Patientenseren .....	48
3.2.5.2 Verdünnung einer hochpositiven TSI-Serumprobe.....	48
3.2.5.3 Testung verschiedener Volumina niedrig, moderat und hochpositiver TSI-Serumproben.....	49
3.2.5.4 Testung klinischer Proben in Duplikaten .....	50
3.2.5.5 Testung klinischer Proben zum Vergleich von 3 Zellwachstumszeiten: ON, 3 h, 2 h .....	50
3.2.5.6 Testung klinischer Proben in 18 Replikaten .....	50
3.2.5.7 Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen: Inkubator vs. RT .....	51
3.2.6 Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204).....	52
3.2.7 Testung von Sensitivität und Spezifität.....	55
3.2.8 Verwendung von Graphen .....	56
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
4.1 Stimulation mit monoklonalen Antikörpern: M22, K1-70 .....	57
4.1.1 Testung von M22 in verschiedenen Verdünnungsmedien: Reaktionspuffer (RB) vs. Normalserum (NS) .....	57

4.1.2	Blockade der stimulierenden Aktivität von M22 durch K1-70 .....	61
4.1.3	Testung von M22 mit verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen .....	66
4.2	Stimulation mit Patientenseren und euthyreoten Kontrollen .....	72
4.2.1	Verdünnung einer hochpositiven TSI-Serumprobe .....	72
4.2.2	Testung verschiedener Volumina niedrig, moderat und hochpositiver TSI-Serumproben .....	74
4.2.3	Testung klinischer Proben in Duplikaten .....	77
4.2.4	Testung klinischer Proben zum Vergleich von 3 Zellwachstumszeiten: ON, 3 h, 2 h .....	79
4.2.5	Testung klinischer Proben in 18 Replikaten .....	82
4.2.6	Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen: Inkubator vs. RT .....	84
4.3	Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204) .....	92
4.4	Testung von Sensitivität und Spezifität .....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>104</b>
5.1	Stimulation mit monoklonalen Antikörpern: M22, K1-70 .....	104
5.2	Stimulation mit Patientenseren und euthyreoten Kontrollen .....	109
5.2.1	Diskussion der Versuchsergebnisse .....	109
5.2.2	Besonderheiten der Testung mit Patientenseren .....	115
5.3	Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204) .....	117
5.4	Testung von Sensitivität und Spezifität .....	119
5.5	Klinischer Gebrauch und Assay-Evaluation .....	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>134</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AITD	autoimmune Schilddrüsenerkrankung (autoimmune thyroid disease)
AS	Aminosäure
AUC	Area Under the Curve
Blk	Leerwert (Blank)
bTSH	bovines TSH
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAS	Cell Attachment Solution
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
DHI	Diagnostic Hybrids, Inc.
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration (half maximal effective concentration)
EO	endokrine Orbitopathie
exkl.	exklusive
FDA	Food and Drug Administration
FRTL	Fisher rat thyroid cell line
GM	Wachstumsmedium (Growth Medium)
GS	GloSensor™
hMAb	humaner monoklonaler Antikörper
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

HP	high positive
HT	Hashimoto-Thyreoiditis
IgG	Immunglobulin der Klasse G
inkl.	inklusive
IS	international standard
IU	international units
JGU	Johannes Gutenberg-Universität
JP	Jason Perret
L/l	Liter
LATS	langwirksamer Schilddrüsenstimulator (long acting thyroid stimulator)
LH-CG-R	Luteinisierendes Hormon-Choriogonadotropin-Rezeptor
mAK	monoklonaler Antikörper
MB	Morbus Basedow
neg.	negativ
NS	Normalserum
ON	über Nacht (overnight)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pos.	positiv
RB	Reaktionspuffer (Reaction Buffer)
RIA	Radioimmunoassay
RLU	Relative Lichteinheiten (relative light units)
ROC	receiver operating characteristic
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S/B	Signal zu Hintergrund (Signal to Background)



## Abkürzungsverzeichnis

---

SF	Standardfehler
SP	Serumpanel
SRR%	Specimen-to-Reference Ratio in % (Percentage of specimen-to-reference ratio)
Tab.	Tabelle
TBI	TSH-Rezeptor-blockierende Immunglobuline (TSH-R-blocking immunoglobulins)
TBII	TSH-Rezeptor-Antikörper (TSH-R binding inhibitory immunoglobulins), Bestimmung via Bindungs-Immunoassay
TRAb	thyrotropin receptor antibodies
TRAK	TSH-Rezeptor-Autoantikörper
TSH	thyroidea-stimulierendes Hormon
TSH-R	TSH-Rezeptor
TSH-R-Ak	TSH-Rezeptor-Antikörper (TSH-R antibodies)
TSI	TSH-Rezeptor-stimulierende Immunglobuline (TSH-R-stimulating immunoglobulins)
ULP	ultra low positive
vgl.	vergleiche
vs.	versus
wt	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Konstrukt der Plasmide GloSensor™-20F cAMP und GloSensor™-22F cAMP im Vergleich .....	32
Abb. 2	Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von M22 in den Konzentrationen von 400 ng/ml bis 0,39 ng/ml in NS und RB.....	44
Abb. 3	Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von M22 in den Konzentrationen von 200 ng/ml bis 3 ng/ml in NS.....	45
Abb. 4	Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von K1-70 in den Konzentrationen von 1000 ng/ml bis 3 ng/ml in NS.....	45
Abb. 5	Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von M22 in den Konzentrationen von 200 ng/ml bis 0,0125 ng/ml in NS.....	46
Abb. 6	Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe einer hochpositiven MB-Patientenprobe in NS (1:11) .....	49
Abb. 7	Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von des IS 08/204 in den Konzentrationen von 113 mIU/ml bis 0,0156 mIU/ml in NS und PBS .....	53
Abb. 8	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC <sub>50</sub> , 10 - 60 min.....	57
Abb. 9	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in RB und EC <sub>50</sub> , 10 - 60 min.....	58
Abb. 10	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC <sub>50</sub> , 10 - 30 min.....	58
Abb. 11	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC <sub>50</sub> , 40 - 60 min.....	59
Abb. 12	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 100 ng/ml in RB und EC <sub>50</sub> , 10 - 30 min .....	59
Abb. 13	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 100 ng/ml in RB und EC <sub>50</sub> , 40 - 60 min.....	60
Abb. 14	S/B Ratio nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC <sub>50</sub> , 10 - 60 min .....	60

Abb. 15	S/B Ratio nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in RB und EC <sub>50</sub> , 10 - 60 min .....	61
Abb. 16	RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 24 ng/ml .....	62
Abb. 17	RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml .....	62
Abb. 18	RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml .....	63
Abb. 19	RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 3 ng/ml .....	63
Abb. 20	RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (3 - 500 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml und Kontrolle .....	64
Abb. 21	% Inhibition der stimulierenden Aktivität von M22 (12 ng/ml) durch 6 K1-70 Konzentrationen (3 - 500 ng/ml) .....	65
Abb. 22	RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (3 - 500 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml und Kontrolle .....	65
Abb. 23	% Inhibition der stimulierenden Aktivität von M22 (6 ng/ml) durch 6 K1-70 Konzentrationen (3 - 500 ng/ml) .....	66
Abb. 24	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 1 h Inkubationszeit, 10 - 60 min .....	67
Abb. 25	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 2 h Inkubationszeit, 10 - 60 min .....	67
Abb. 26	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 1 h Inkubationszeit in SRR%, 10 - 60 min. ....	67
Abb. 27	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 2 h Inkubationszeit in SRR%, 10 - 60 min. ....	68

Abb. 28	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,01 bis 50 ng/ml in NS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen, 30 und 40 min .....	69
Abb. 29	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,01 bis 50 ng/ml in NS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen in SRR%, 30 und 40 min.....	69
Abb. 30	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 und 90 min RT .....	70
Abb. 31	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 und 90 min RT in SRR% .....	70
Abb. 32	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> ) und 0, 10, 30 min RT .....	71
Abb. 33	Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> ) und 0, 10, 30 min RT in SRR%.....	71
Abb. 34	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Probe in den Verdünnungen 1:11 bis 1:2816 in verdünntem NS, 10 - 30 min .....	72
Abb. 35	Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Probe in den Verdünnungen 1:11 bis 1:2816 in verdünntem NS, 40 - 60 min .....	73
Abb. 36	Thyretain® TSI Bioassay: Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Probe in den Verdünnungen 1:22 bis 1:2816 in verdünntem NS in SRR%.....	73
Abb. 37	RLU-Werte einer moderat positiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl .....	74
Abb. 38	S/B Ratio nach Stimulation mit einer moderat positiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl.....	74
Abb. 39	RLU-Werte einer hochpositiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl..	75

Abb. 40	S/B Ratio nach Stimulation mit einer hochpositiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl.....	75
Abb. 41	RLU-Werte von 4 TSI-Proben im Vergleich in Volumina von 1 - 10 µl .	76
Abb. 42	S/B Ratio nach Stimulation mit 4 verschiedenen TSI-Proben im Vergleich in Volumina von 1 - 10 µl.....	76
Abb. 43	RLU-Werte von 5 NS und 7 niedrig positiven TSI-Proben.....	77
Abb. 44	SRR%-Werte von 5 NS und 7 niedrig positiven TSI-Proben .....	78
Abb. 45	RLU-Werte von 6 moderat und 7 hochpositiven TSI-Proben .....	78
Abb. 46	SRR%-Werte von 6 moderat und 7 hochpositiven TSI-Proben.....	79
Abb. 47	Zellmorphologien der CHO Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit.....	79
Abb. 48	RLU-Werte von 5 NS im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.....	80
Abb. 49	RLU-Werte von 7 niedrig TSI-positiven Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.....	80
Abb. 50	RLU-Werte von 6 moderat TSI-positiven Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.....	81
Abb. 51	RLU-Werte von 7 hoch TSI-positiven Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.....	81
Abb. 52	RLU-Werte aller getesteten Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit, 40 min .....	82
Abb. 53 + 54	RLU-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 1 h vs. 2 h Inkubationszeit im Inkubator.....	85
Abb. 55 + 56	SRR%-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 1 h vs. 2 h Inkubationszeit im Inkubator.....	85
Abb. 57	RLU-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 60 min im Inkubator + 30 min bei RT .....	86
Abb. 58	SRR%-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 60 min im Inkubator + 30 min bei RT .....	86

Abb. 59	RLU-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 90 min bei RT .....87
Abb. 60	SRR%-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 90 min bei RT .....87
Abb. 61	RLU-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min im Inkubator mit 0, 10 und 30 min anschließender Inkubationszeit bei RT .....88
Abb. 62	SRR%-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min im Inkubator mit 0, 10 und 30 min anschließender Inkubationszeit.....88
Abb. 63	SRR%-Werte der 9 NS, 9 niedrig und 5 moderat positiven TSI-Proben nach 60, 70, 80, 90 min Inkubation bei RT .....89
Abb. 64	SRR%-Werte der 5 hochpositiven TSI-Proben nach 60, 70, 80, 90 min Inkubation bei RT .....89
Abb. 65	SRR%-Werte der 9 NS, 9 niedrig und 5 moderat positiven TSI-Proben nach 60 min im Inkubator + 0/10/20/30 min bei RT .....90
Abb. 66	SRR%-Werte der 5 hochpositiven TSI-Proben nach 60 min im Inkubator + 0/10/20/30 min bei RT .....90
Abb. 67	Fold Increase der 9 niedrig, 5 moderat und 5 hochpositiven TSI-Proben im Thyretain® TSI Bioassay und im GS Assay nach 90 min RT vs. 60 min im Inkubator + 30 min bei RT im Laborvergleich .....91
Abb. 68	Kalibrationskurven anhand von 12 WHO IS-Konzentrationen auf 28 Platten nach 60 min Messzeit mit Eintrag der hochpositiven Kontrolle, 5-PL.....93
Abb. 69	Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 12 WHO IS-Konzentrationen anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL .....94
Abb. 70	Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 8 M22-Standardkonzentrationen anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL.....94
Abb. 71	Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 4 Kontrollen anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL.....94

Abb. 72	Verteilung der errechneten IU/L-Werte aller 24 negativen und 24 positiven Proben anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL.....	95
Abb. 73	Kalibrationskurven anhand von 8 M22-Standardkonzentrationen auf 28 Platten nach 60 min Messzeit mit Eintrag der hochpositiven Kontrolle, 5-PL.....	96
Abb. 74	Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 12 WHO IS-Konzentrationen anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL	97
Abb. 75	Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 8 M22-Standardkonzentrationen anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL.....	97
Abb. 76	Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 4 Kontrollen anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL.....	97
Abb. 77	Verteilung der errechneten IU/L-Werte aller 24 negativen Proben anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL .....	98
Abb. 78	Verteilung der errechneten IU/L-Werte aller 24 positiven Proben anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL.....	98
Abb. 79	Kalibrationskurven anhand von 8 M22-Standardkonzentrationen auf 17 Platten nach 60 min Messzeit mit Eintrag der niedrigstpositiven Kontrolle, 5-PL.....	99
Abb. 80	Verteilung der getesteten Proben nach errechneter Konzentration in IU/L, Einteilung nach Replikaten nach 60 min Messzeit .....	100
Abb. 81	Verteilung der getesteten Proben nach errechneter Konzentration in IU/L, Einteilung nach Mittelwert von 2 von 3 Replikaten nach 60 min Messzeit .....	101
Abb. 82	Verteilung der getesteten Proben nach errechneter Konzentration in IU/L, Einteilung nach Mittelwert von 3 Replikaten nach 60 min Messzeit ...	102
Abb. 83	Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve): Sensitivität und Spezifität .....	103

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwandte Chemikalien .....	33
Tab. 2	Verwandte Verbrauchsmaterialien .....	33
Tab. 3	Verwandte Geräte .....	34
Tab. 4	Verwandte Kits .....	35
Tab. 5	Verwandte Zelllinien .....	35
Tab. 6	Übersichtstabelle Optimierungsparameter (Teil I + II) .....	39
Tab. 7	Einteilung der Patientenseren in SRR%-Bereiche anhand Thyretain® TSI Bioassay.....	48
Tab. 8	Verwendung von Seren: Verdünnung einer hochpositiven TSI-Serumprobe .....	48
Tab. 9	Verwendung von Seren: Testung verschiedener Volumina niedrig, moderat und hochpositiver TSI-Serum Proben (I) .....	49
Tab. 10	Verwendung von Seren: Testung verschiedener Volumina niedrig, moderat und hochpositiver TSI-Serum Proben (II) .....	50
Tab. 11	Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben in Duplikaten.....	50
Tab. 12	Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben in 18 Replikaten..	51
Tab. 13	Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (I) .....	51
Tab. 14	Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (II) .....	51
Tab. 15	Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (III) .....	52
Tab. 16	Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (IV).....	52
Tab. 17	Versuchsübersicht der Messung von 28 Platten mit 4 IS-Panels (A - D) und 3 Serumpanels (je 16 Proben mit je 8 TSI-pos. und je 8 TSI-neg. Proben) in Kombination.....	53
Tab. 18	Einteilung der Patientenseren in IU/L-Bereiche nach Siemens Immulite® TSI Assay (I) .....	54



Tab. 19	Verwendung von Seren: Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204).....	54
Tab. 20	Verwandte Standardkonzentrationen A-H in IU/L.....	55
Tab. 21	Einteilung der Patientenseran in IU/L-Bereiche nach Siemens Immulite® TSI Assay (II) .....	55
Tab. 22	Verwendung von Seren: Testung von Sensitivität und Spezifität .....	56
Tab. 23	RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 10 min Messzeit.....	82
Tab. 24	RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 20 min Messzeit.....	83
Tab. 25	RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 30 min Messzeit.....	83
Tab. 26	RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 40 min Messzeit.....	83
Tab. 27	RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 50 min Messzeit.....	84
Tab. 28	RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 60 min Messzeit.....	84
Tab. 29	Tabellarische Übersicht der Fold Increase-Werte der Patientenseran des Laborvergleichs zwischen JGU und DHI (ergänzend zu Abb. 67).....	91
Tab. 30 + 31	Vier-Felder-Tafel für Replikat 1 und Replikat 2 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min.....	100
Tab. 32	Vier-Felder-Tafel für Replikat 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min .....	101
Tab. 33 + 34	Vier-Felder-Tafel für Replikat 1 + 2 und 1 + 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min.....	101
Tab. 35	Vier-Felder-Tafel für Replikat 2 + 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min .....	102
Tab. 36	Vier-Felder-Tafel für Replikat 1 + 2 + 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min .....	103

# 1 Einleitung

Das Krankheitsbild des Morbus Basedow (MB) als eine autoimmune Erkrankung der Schilddrüse ist in der klinischen Praxis für niedergelassene und klinisch tätige Ärzte eine häufige Entität. Pathogenetisch verantwortlich sind Antikörper gegen die auf den Schilddrüsenzellen befindlichen Rezeptoren für das thyroidea-stimulierende Hormon (TSH-Rezeptoren, TSH-R), die durch Stimulation eine Hyperthyreose induzieren (Diana, Brown et al. 2014, Kahaly and Diana 2017, Kahaly, Diana et al. 2020).

Auf Zellebene sorgen G-Protein-gekoppelte Transmembranproteine dafür, dass bei entsprechender Stimulation durch TSH oder pathologische, stimulierende Autoimmunantikörper (TSH-Rezeptor-stimulierende Immunglobuline, TSI) innerhalb der thyroidalen Zelle ein Anstieg des zyklischen Adenosin-3',5'-monophosphats (cAMP) stattfindet, der die Signalkaskade des cAMP in Gang setzt. Auf diese Weise werden das Wachstum und die Aktivität der Schilddrüse stimuliert. Begleitend kann der Patient durch die Expression des TSH-R unter anderem im orbitalen Fettgewebe eine endokrine Orbitopathie (EO) entwickeln (Ponto, Schuppan et al. 2014, Kampmann, Diana et al. 2015, Ponto, Binder et al. 2015, Kahaly, Diana et al. 2016, Diana and Kahaly 2018, Kahaly, Wuster et al. 2019, Diana, Ponto et al. 2020, Hai, Lee et al. 2020).

Um das Stadium der Erkrankung einschätzen, den Verlauf kontrollieren und die Prognose durch adäquate Therapie verbessern zu können (Kahaly, Diana et al. 2020), existieren diagnostische Testverfahren, die zum Ziel haben, die Konzentration der TSI im Serum der Patienten zu messen. Insbesondere soll hier der etablierte, zellbasierte Thyretain® TSI Bioassay angeführt werden, der mithilfe eines *Luciferase*-Gens die Antikörper-Konzentration im Serum durch Lichtsignale im Luminometer misst (Lytton, Li et al. 2010, Leschik, Diana et al. 2013, Diana, Kanitz et al. 2015). Dieses Verfahren stellt aktuell die Referenzmethode zur Bestimmung der TSI-Konzentration dar.

Ziel dieser Dissertation soll es nun sein, zum einen die Entwicklung eines neuen, schneller durchführbaren, cAMP-basierten Assays und zum anderen seine Standardisierung aufzuzeigen.

Bei diesem neuartigen, ebenfalls zellbasierten Assay sind die cAMP-Bindungsdomänen der verwandten Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO) an ein Plasmid gekoppelt, das die Lichtreaktion im Luminometer abhängig von der im

Serum vorhandenen Antikörperkonzentration freisetzt. Im Laufe der Entwicklung wurden Verdünnungsmedium, Volumenmenge, Zellwachstumszeit, Inkubationszeit und -bedingungen sowie Messzeit zur Optimierung des Protokolls angepasst. Im Zuge dessen wurde der Test mit monoklonalen und im Anschluss mit polyklonalen Antikörpern in den Seren von MB-Patienten, die bereits positiv im Thyretain® TSI Bioassay getestet wurden, und gesunden Kontrollen durchgeführt, um frühzeitig eine klinische Ausrichtung des Assays zu ermöglichen. Dazu trug auch die Testung mit einer stark verdünnten, im Thyretain® TSI Bioassay hoch positiv getesteten Probe bei.

Des Weiteren erfolgten die internationale Standardisierung des Tests mittels des zweiten internationalen Standards der WHO (NIBSC-Code 08/204) und die Erstellung von Kalibrationskurven, welche schließlich die Konvertierung der Messergebnisse in internationale Einheiten pro Liter (IU/L) erlaubten. Dies fand im Rahmen von zwei Studien statt, die neben der Funktionalität des WHO-Standards auch umfangreich im Siemens Immulite® TSI Assay positiv getestete Patientenproben und negative Kontrollen in Bezug auf Sensitivität und Spezifität des Assays untersuchten.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen

Bei der Pathogenese der autoimmunen Hyperthyreose, dem Morbus Basedow, bildet der TSH-Rezeptor auf den thyroidalen Zellen das zentrale Antigen. Über diesen werden im physiologischen Zustand durch TSH aus dem anterioren Hypophysenlappen sowohl das Schilddrüsenwachstum als auch Hormonproduktion und -sekretion gesteuert.

Im Falle des MB führt die Einwanderung von Immuneffektorzellen und schilddrüsenpezifischen T-Zellen in das thyroide Gewebe zu einer Produktion von Autoantikörpern gegen verschiedene Epitope des exprimierten TSH-Rezeptors (Smith and Hegedüs 2014). Dieser stellt einen G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptor aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit dar, dessen Ektodomäne zentral für die Antikörperbindung ist (Rees Smith, McLachlan et al. 1988, Loosfelt, Pichon et al. 1992). An ihr können Antikörper gegen den TSH-R (TRAK) mit unterschiedlicher Funktionsweise wirken: Stimulierende Antikörper (TSI), deren Existenz und Rolle in der Entstehung des MB erstmals in den späten 1950er-Jahren erst im Tierversuch (Adams 1958) und anschließend anhand Schilddrüsenmembranmaterial (Smith and Hall 1974) belegt wurde, binden an die Konformationsepitope des TSH-R, wirken kompetitiv zum TSH und induzieren durch ständige, unregulierte Stimulation via cAMP-Kaskade die pathologische Schilddrüsenhyperplasie und die gesteigerte Hormonsynthese und -sekretion (Michalek, Morshed et al. 2009, Morshed and Davies 2015).

Im Gegensatz dazu steht das Funktionsniveau der blockierenden Antikörper (TBI), die die TSH-Aktivität antagonisieren oder blockieren, jedoch keine cAMP-Signalwege in Gang setzen, sodass eine autoimmune Hypothyreose resultiert, deren bekanntester Vertreter die Hashimoto-Thyreoiditis (HT) ist (Kahaly and Diana 2017). Als Smith und Hall 1974 die Verhinderung der TSH-Bindung durch stimulierende Antikörper in Gewebe von MB-Patienten nachweisen konnten, erkannten sie auch die Ähnlichkeit der Antikörper, die in einer geringen Anzahl an Hashimoto-Patienten zu finden war (Smith and Hall 1974). Nach heutigem Kenntnisstand geht man von 10 % der Patienten mit einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung (AITD) aus, die TBI aufweisen (Diana, Krause et al. 2017). Doch auch TSI sind in HT-Patienten im Bereich des Möglichen,

vor allem, wenn zusätzlich eine Beteiligung von okulärem Gewebe vorliegt (Kahaly, Diana et al. 2016). Interessant ist in diesem Kontext zudem, dass durch vielerlei Faktoren ein Übergang von einer TSI- zu einer TBI-Dominanz mit begleitendem Wechsel von einer Hyperthyreose in eine Hypothyreose und umgekehrt (McLachlan and Rapoport 2013) und demnach eine Koexistenz beider Antikörper in einem Patienten möglich ist (Evans, Sanders et al. 2010, Diana, Krause et al. 2017).

Eine dritte Antikörper-Subgruppe, die der „neutralen“ Antikörper, wurde in der Vergangenheit von Morshed *et al.* im Hinblick auf ihre Rolle bei der Pathogenese des MB untersucht: Es lässt sich aktuell weder eine cAMP-induzierende noch blockierende Wirkung dieser Antikörper noch eine Wirkung auf die TSH-Bindung nachweisen, jedoch scheinen alternative Signalwege eine mögliche Rolle in der Zellapoptose zu spielen (Morshed, Ando et al. 2010, Morshed, Ma et al. 2013).

Auch wenn im Falle des MB die Schilddrüse zentraler Schauplatz des pathologischen Geschehens bleibt, ist schon länger bekannt, dass der TSH-R auch in anderen Geweben exprimiert wird, insbesondere in orbitalen Fibroblasten (Bahn, Dutton et al. 1998), was zur Manifestation als EO führt. Es wurde gezeigt, dass Patienten, die zusätzlich zum MB eine EO aufweisen, höhere, mit Krankheitsschwere und -aktivität korrelierende TSH-R-Ak-Serumkonzentrationen aufweisen (Lytton, Ponto et al. 2010, Kahaly, Wuster et al. 2019). Ein vergleichbarer Pathomechanismus, die Fibroblastenproliferation via TSH-R mit anschließender Glykosaminoglykaneinlagerung, liegt der Entstehung des prätibialen Myxödems und der Hyperthyreose-induzierten Akropachie zugrunde; ihre Manifestation ist jedoch wesentlich seltener als die der EO (Bartalena and Fatourechhi 2014).

Unter dem Gesichtspunkt, dass man von einer Prävalenz der AITD von 2 - 3 % in der Allgemeinbevölkerung ausgeht (Smith and Hegedüs 2014), von der circa 1 - 1,5 % auf den MB entfallen (Kahaly, Bartalena et al. 2018), liegt die Notwendigkeit entsprechender diagnostischer Methoden in Form von Assays zur Bestimmung der TSH-R-Ak-Konzentrationen der Patienten auf der Hand, um Prognose und Handlungsentscheidungen daraus ableiten zu können.

Zu diesem Zweck wurden zwei Typen von Assays entwickelt: Bindungs-Immunoassays messen die Höhe der TSH-R-Antikörper (TBII), ohne Informationen über die Eigenschaften dieser Antikörper zu geben, während zellbasierte Bioassays in

der Lage sind, TSI von TBI und damit ihre Funktionalität zu unterscheiden (Kahaly and Diana 2017, Kahaly, Diana et al. 2020).

Die folgenden beiden Kapitel geben einen Überblick über die Forschungsgeschichte auf den Gebieten dieser zwei Assay-Typen, wobei der Fokus auf den Bioassays liegen soll.

## **2.2 Historie: Bindungs-Immunoassays zur Detektion der Antikörperbindung**

Zur laborchemischen Diagnose des MB *in vitro* wird die Bestimmung der TRAK, der TSH-Rezeptor-Antikörper, den aktuellen Leitlinien entsprechend empfohlen (Kahaly, Bartalena et al. 2018). Dies geschieht über mittlerweile international standardisierte Bindungs-Immunoassays, die sich die kompetitiven Vorgänge am TSH-R zunutze machen, um die Höhe der TBII im Patientenserum zu messen. Nachdem zuvor bovines TSH (bTSH) als Kompetitor zu den zu messenden Autoantikörpern verwandt worden war, wurde es dank der erfolgreichen Isolation eines humanen, monoklonalen Antikörpers (mAK) namens M22 aus Lymphozyten eines MB-Patienten durch Sanders, Evans *et al.* 2003 durch letzteres ersetzt (Sanders, Evans et al. 2003, Zophel, Roggenbuck et al. 2010). M22 zeigte durch seine hohe Bindungsaffinität und stimulierende Wirkung auf die cAMP-Kaskade eine verbesserte Sensitivität und Präzision im Bindungs-Immunoassay (Smith, Bolton et al. 2004). Ein entsprechender inhibierender monoklonaler Antikörper (K1-70), der sowohl die TSH- als auch die TSI-Bindung antagonisiert, wurde einige Jahre später isoliert (Evans, Sanders et al. 2010) und gemeinsam mit M22 hinsichtlich seiner Effektivität *in vivo* im Tierversuch untersucht (Furmaniak, Sanders et al. 2012).

## **2.3 Historie: Bioassays zur Bestimmung der funktionalen Antikörperaktivität**

Um jedoch zwischen den funktionalen Antikörper-Typen, vor allem zwischen stimulierenden und blockierenden, unterscheiden zu können, stellte es sich als notwendig heraus, den TSH-R als vollständigen Rezeptor auf Zellen zu exprimieren und die resultierenden Signale nach Ligandenbindung zu quantifizieren.

### 2.3.1 *In vivo*-Assays

Ihren Anfang nahm die Entwicklung von Bioassays zum Nachweis der TSH-R-Ak in Form eines Tiermodells *in vivo*, das nach der Entdeckung eines langwirksamen Stimulators der Schilddrüse (long acting thyroid stimulator, LATS) in MB-Patienten (Adams 1958, Purves and Adams 1960), der später als Antikörper identifiziert wurde (Kriss, Pleshakov et al. 1964, Dorrington, Carneiro et al. 1966, Brown, Ensor et al. 1968), nach der Methode von McKenzie durchgeführt wurde: Nachdem eine Radiojod-Injektion die Schilddrüse der Mäuse markiert hatte, wurde sie per TSH- oder LATS-Injektion stimuliert, wobei ihre natürliche Schilddrüsenfunktion durch Thyroxin-Applikation supprimiert wurde. Im Anschluss erfolgte anhand der Radioaktivität im Blut die Messung der Hormonsynthese und -sekretion und somit des Effekts der Stimulatoren auf den TSH-R; eine Standardisierung anhand LATS-IgG-Standards erlaubte schließlich die Quantifizierung in Patientenseren (McKenzie 1958). Eine Korrelation zwischen LATS im Serum der Patienten und Schilddrüsenaktivität sowie dem Vorkommen extrathyroidaler Manifestationen konnte auf diese Weise belegt werden (McKenzie 1958, Burke 1968, Lytton and Kahaly 2010).

Der erste Schritt zu einem *in vitro* durchgeführten Bioassay erfolgte mithilfe von murinem Schilddrüsengewebe, das mit Patientenserum inkubiert wurde; anschließend wurde der Stimulationserfolg anhand der Radiojod-Freisetzung evaluiert (Brown, Ensor et al. 1968). In den 1970er-Jahren wurde das Mausgewebe durch Schilddrüsenzellen des Schweins ersetzt (Planells, Fayet et al. 1975, Lytton and Kahaly 2010).

Weithin ungeklärt blieben jedoch die Prozesse auf Rezeptorebene, die allein durch die Messung des Jod-Endpunkts nicht untersucht werden konnten. Mit humanem Material gelang es schließlich, die IgG-Antikörper im MB-Patientenserum als kompetitiv zum jodmarkierten TSH zu identifizieren (Smith and Hall 1974, Teng, Smith et al. 1975, Bryson, Joasoo et al. 1976). Diese Erkenntnis führte in der Folge dazu, dass dem cAMP-Signalweg innerhalb der Schilddrüsenzelle eine hohe diagnostische Rolle zufiel, zumal Onaya, Kotani *et al.* 1973 eine höhere cAMP-Konzentration in humanem Schilddrüsengewebe nach Inkubation mit MB-Patientenseren im Gegensatz zu euthyreoten Normalkontrollen nachweisen konnten (Onaya, Kotani et al. 1973); zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch weitere Arbeitsgruppen, die mit humanen Schilddrüsenzellen und Radioimmunoassays (RIA) arbeiteten (Kasagi, Konishi et al.

1982, Rapoport, Filetti et al. 1982). Als problematisch stellten sich jedoch die Beschaffung humanen Materials sowie differierende Ergebnisse in Abhängigkeit vom Operateur heraus, sodass sich die Forschung wieder der tierischen Zellkultur zuwandte (Lytton and Kahaly 2010) und eine Zelllinie aus Ratten (Fisher rat thyroid cell line, FRTL-5) gewonnen werden konnte (Ambesi-Impiombato, Parks et al. 1980). Diese zeigte als kontinuierliche Kultur reproduzierbare cAMP-Konzentrationen sowohl mit monoklonalen als auch mit IgG-Präparaten aus MB-Patientenseren allerdings unter Inkaufnahme einer mehrtägigen Prozedur (Vitti, Rotella et al. 1983, Ealey, Mitchell et al. 1988). Schließlich fand auch eine Modifikation des Assays statt, die die direkte Verwendung von Serum ohne IgG-Aufbereitung ermöglichte (Vitti, Chiovato et al. 1988).

### **2.3.2 Zellbasierte Assays mit endogener TSH-Rezeptor-Expression**

Die Verwendung der FRTL-Zelllinie zur cAMP-Bestimmung verlor erst an Bedeutung, als das Klonen des humanen TSH-R gelang (Parmentier, Libert et al. 1989) und sich damit die Möglichkeit einer Transfektion in tierische Zellen ergab, um statt des TSH-R der Ratte mit dem humanen TSHR-R eine größere Nähe zwischen Klinik und Diagnostik zu schaffen. Verwandt wurden Ovarzellen des chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovary, CHO), die zunächst mit dem TSH-R-Wildtyp (wt) (Perret, Ludgate et al. 1990) als Jason Perret (JP)-Zellen hergestellt und kurz darauf in ersten Assays getestet wurden. Insbesondere die Zelllinien JP26 und JP09, deren Unterschiede von Wallaschofski und Paschke 1999 erarbeitet wurden, erreichten bezüglich ihrer Sensitivität der cAMP-Bestimmung vergleichbare Ergebnisse wie die Referenzmethode mit humanen Schilddrüsenzellen (Wallaschofski and Paschke 1999). Sie erlaubten eine verkürzte und vereinfachte Assay-Durchführung im Vergleich zum FRTL-Assay zusätzlich mit den Vorteilen, direkt mit einem humanen Antigen zu arbeiten, eine höhere positive Anzahl der MB-Patienten mit aktiver Hyperthyreose zu detektieren und eine höhere Reproduzierbarkeit zu besitzen (Ludgate, Perret et al. 1990, Vitti, Elisei et al. 1993, Michelangeli, Munro et al. 1994). Die von Kim, Faiman et al. durchgeführten Arbeiten belegen nochmals in eindeutiger Weise den Gewinn an Sensitivität gegenüber den FRTL-Zellen (92,2 % vs. 74,5 %) (Kim, Faiman et al. 1997). Anschließend konnte der Assay zudem für den klinischen Gebrauch modifiziert werden, sodass nun auch unfraktioniertes Serum direkt gemessen werden konnte (Morgenthaler, Pampel et al. 1998) oder Zellen für den unkomplizierteren Gebrauch eingefroren werden konnten (Takano, Sumizaki et al. 1997); daraufhin wurde es in



weiteren klinischen Studien evaluiert (Schott, Minich et al. 2005, El Fassi, Banga et al. 2009).

### **2.3.3 Zellbasierte Assays mit rekombinanter TSH-Rezeptor-Expression**

Um neben der klinischen Diagnostik auch die molekulare Ebene der TSH-R-Ak-Bindung an den Rezeptor genauer zu untersuchen, wurde der TSH-R von Tahara, Ban *et al.* zu einer Chimäre verändert, indem die Aminosäurereste 8 - 165 des TSH-R durch die korrespondierenden Segmente des LH-CG-R (Luteinisierendes Hormon-Choriogonadotropin-Rezeptors) ersetzt wurden (Tahara, Ban et al. 1991). Diese CHO Mc1+2-Zelllinie war nach wie vor in der Lage, TSH-Bindung und in eingeschränktem Maße auch TBI-Bindung aus Seren von Patienten mit idiopathischem Myxödem zu erkennen; die TSI in MB-Patientenserum konnten jedoch größtenteils nicht mehr detektiert werden. Daraus gingen die Erkenntnisse hervor, dass die diversen Antikörpergruppen an verschiedene Epitope binden und insbesondere die Aminosäurereste 8 - 165 spezifisch für TSI sein müssen (Tahara, Ban et al. 1991). Die chimärische Zelllinie CHO Mc4 (AS-Reste 261 - 370 ausgetauscht) zeigte dagegen sowohl eine TSI- wie auch eine TSH-Reaktion, eine TBI-Reaktion jedoch blieb aus (Tahara, Ishikawa et al. 1997). Die Arbeitsgruppe postulierte also entsprechend ihren Ergebnissen, dass TSI an die N-terminale Untereinheit der TSH-R-Ektodomäne binden müsse, während TBI die C-terminale Untereinheit bevorzuge. Im Vergleich der Mc1+2-Zelllinie mit wt-Zellen zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, wobei durch die parallele TBII-Messung eine Rolle der TBI in MB-Patienten als wahrscheinlich erachtet wurde (Grasso, Kim et al. 1999). Weitere Ergebnisse ließen außerdem darauf schließen, dass trotz der obig ausgeführten Erkenntnisse mit Mc-Zellen auch Epitope vorliegen müssen, die von beiden Antikörperfunktionalitäten genutzt werden (Latif, Teixeira et al. 2012).

Die vielversprechenden Ergebnisse, insbesondere die hohe Sensitivität der transfektierten Zelllinien und die gute Messbarkeit des cAMP als Endpunkt, führten zu weiteren Assay-Entwicklungen auf diesem Gebiet. Neuartig war die Transfektion der Zellen mit einem *Luciferase*-Reporter gen, das via CREB (cAMP response element-binding protein) die TSI-abhängige Lichtantwort detektiert (de Wet, Wood et al. 1985, Himmler, Stratowa et al. 1993, Watson, Ajjan et al. 1998). Die Ergebnisse von Watson, Ajjan *et al.*, denen CHO C6-13 wt-Zellen zugrunde lagen, zeigten erhebliche Vorteile

wie Zeitersparnis, Arbeiten ohne radioaktive Substanzen und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem bislang etablierten Assay, das JP09-Zellen verwandte. Nebst weiteren Studien mit wt-Zellen (Evans, Morgenthaler et al. 1999, Hovens, Buiting et al. 2006) zur Detektion von TSI folgten auch entsprechende Assays zur TBI-Bestimmung, die sich die *Luciferase*-Gen-Transfektion zunutze machten (Jordan, Rinderle et al. 2001, Minich, Lenzner et al. 2004).

Der nächste Meilenstein in der TSI-Assay-Entwicklung gelang schließlich den Arbeitsgruppen um Lytton, Ponto *et al.* und Kamijo, Murayama *et al.*, welche sich Assays mit der CHO K1-Zelllinie zuwandten (Kamijo, Murayama et al. 2010, Lytton, Ponto et al. 2010). Erstere unternahm einen Vergleich zwischen chimärischen Mc4-Zellen, in welchen die AS-Reste 262 - 335 des humanen TSH-R durch ein entsprechendes Element des LH-R der Ratte ausgetauscht wurden, und wt-Zellen, wobei die Ergebnisse der beiden Assays in Serum von 200 MB-Patienten und darunter auch solchen mit zusätzlicher EO untersucht und mit einem Bindungs-Immunoassay verglichen wurden. Dabei zeigte sich, dass alle hyperthyreoten Patienten TSI-positiv getestet wurden und bezüglich Sensitivität (wt: 80 %, Mc4: 85 %) und Spezifität (wt: 95 %, Mc4: 100 %) die Mc4-Zellen gegenüber den wt-Zellen einen Vorteil besaßen; auch der Variationskoeffizient (coefficient of variation, CV) fiel deutlich zugunsten der chimärischen Zelllinie aus (Lytton, Ponto et al. 2010). Jedoch fiel auf, dass die TSI-Werte der EO-Patienten um das 3-8fache höher waren als die der MB-Patienten, wobei sich letztere größtenteils unter medikamentöser Therapie befanden. Eine starke Korrelation mit Krankheitsschwere und -aktivität der EO im Vergleich zu TRAK-Bindungs-Immunoassays konnte außerdem nachgewiesen werden, genauso wie gesteigerte Sensitivität (97 % vs. 77 %) und Spezifität (89 % vs. 43 %) und erweiterte damit die zuvor auf dem Gebiet durchgeführten Arbeiten (Eckstein, Plicht et al. 2006, Eckstein, Mann et al. 2009).

Nach diesen Erkenntnissen lag es nahe, die Entwicklung des Mc4-Assays weiter zu verfolgen, Seren von Patienten mit diversen Schilddrüsenerkrankungen im Assay zu testen und seine Funktionalität im Vergleich mit TRAK-Bindungs-Immunoassays zu evaluieren (Lytton, Li et al. 2010, Kamijo, Murayama et al. 2011), sodass er schließlich als erster von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassener TSI-Assay kommerziell erhältlich war (vgl. 2.3 Aktuelle Messmethoden). Dieser Assay wurde ebenfalls von Lee, Jang *et al.* genutzt, um seine diagnostische Genauigkeit genauer zu evaluieren und zu postulieren, den Cut-Off des Assays an die Jodversorgung der

Region anzupassen (Lee, Jang et al. 2011), und von einer italienischen Arbeitsgruppe um Giuliani, Cerrone *et al.* Letztere untersuchte ebenfalls die Unterschiede des wt- und chimärischen TSH-R, jedoch unter der Fragestellung, inwieweit die Abwesenheit der Epitope für TBI im Rezeptor der Mc4-Zellen die Sensitivität und Spezifität des Assays im Vergleich zum Holorezeptor der wt-Zellen beeinflusst, was durchaus der Fall zu sein scheint, da sie für die Mc4-Zellen bei 100 % und 98,5 % und damit einige Prozentpunkte über den wt-Zellen liegen (97,3 % und 93,1 %) (Giuliani, Cerrone et al. 2012). Zudem konnten sie in einer anderen Studie zeigen, dass sich TSI im Mc4-Assay durchaus besser als Bindungs-Immunoassays als Parameter zur Vorhersage einer Remission oder eines Rezidivs des MB eignet, da die TSI-Konzentrationen in den Serumproben mit dem Outcome der Patienten korrelierten (Giuliani, Cerrone et al. 2012).

Erwähnenswert in der Entwicklung der Bioassays für TSH-R-Ak ist außerdem der Ansatz, über die Messung von weiteren an der cAMP-Kaskade beteiligten Elementen die Höhe der TSI zu quantifizieren. So dient in einem Assay, das von Tian, Wang *et al.* im Jahr 2012 entwickelt wurde, die cAMP-Ligandenbindung an ein DNA-bindendes Protein dazu, die beiden fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente nach Konformationsänderung zusammenzubringen und das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration abzugeben, was einer direkten cAMP-Messung entspricht (Tian, Wang et al. 2012). In einem Vergleich zum obig erläuterten Luciferase-Bioassay mit chimärischem und wt-TSH-R, das via *Luciferase*-Gen nur die indirekte cAMP-Konzentration misst, konnte eine deutliche Korrelation der beiden Assays bei der Inkubation mit Seren von unbehandelten MB-Patienten nachgewiesen werden, sodass es durchaus als Alternative anzusehen ist (Diana, Olivo et al. 2019).

Eine weitere, neuartige Methode macht sich die Öffnung von Calciumkanälen nach cAMP-Ausschüttung zunutze, um über den im Luminometer messbaren Aequorin-Wert die TSI-Konzentration in der Patientenprobe zu bestimmen. Dies wurde von Araki, Iida *et al.* 2015 auf Basis der Erkenntnisse zur Funktionalität von Aequorin in Assays (Dupriez, Maes et al. 2002) gemeinsam mit einer Standardisierung für diese Methode allerdings im Vergleich zu einem älteren Assay (Kamijo, Nagata et al. 1999) mit dem Ziel unternommen, die Messprozedur nochmals erheblich zu beschleunigen (Araki, Iida et al. 2015).

Zeitgleich stellten Frank, Braeth *et al.* ein Assay vor, das sich eine Bridge-Technologie zunutze machte, indem zwei chimärische Rezeptoren als jeweiliger Bindungsort für die

beiden Arme der Antikörper dienen: Dabei wurde der eine als Ankerpunkt eingesetzt und der andere zur Ausgabe der Chemilumineszenz. Es konnten hohe Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht werden (99,8 % und 99,5 %). Durch weitere Arbeiten konnte allerdings gezeigt werden, dass auch TBI in diesem Bindungs-Immunoassay detektiert werden (Diana, Wuster et al. 2016, Diana, Wuster et al. 2017, Allelein, Diana et al. 2019).

### **2.3.4 Entwicklung von TBI-Assays**

In entsprechender Weise wurde die Forschung auch für Assays zur Messung der blockierenden TSH-R-Ak, TBI, vorangetrieben, mit welchen ihre Fähigkeit zur Blockade der TSH- oder TSI-Wirkung quantifiziert werden sollte (Diana, Olivo et al. 2018).

Äquivalent zur TSI-Bioassay-Entwicklung verwandte man anfänglich Schilddrüsengewebe und -zellen (z. B. Arikawa, Ichikawa et al. 1985), gefolgt von FRTL-5-Zellen der Ratte, mithilfe derer TBI vor allem in Patienten mit idiopathischem Myxödem nachgewiesen werden konnten (Chiovato, Vitti et al. 1987). Noch verlässlichere Ergebnisse ergaben schließlich, wie auch für TSI, die mit dem humanen TSH-R transfektierten CHO Zelllinien, welche zunächst via RIA und in der Folge via *Luciferase*-Reporter gen die TBI-Konzentration maßen und entweder den wt- oder den chimären TSH-R exprimierten (Tahara, Ishikawa et al. 1997, Morgenthaler, Pampel et al. 1998, Grasso, Kim et al. 1999, Jordan, Rinderle et al. 2001, Minich, Lenzner et al. 2004). Zuletzt konnte aus der CHO Mc4-Zelllinie nach Vergleich mit wt-Zellen ein Assay entwickelt werden, das sich durch breite Linearbereiche und eine klare Differenzierung von durch TSH stimulierter Aktivität auszeichnete und durch seine Funktionalität für beide Antikörper-Subgruppen letztendlich vermuten ließ, dass TBI nicht nur an die in diesen Zellen entfernte C-terminale Untereinheit binden (Li, Kim et al. 2013). Der Assay korreliert stark mit den TBII-Werten von AITD-Patienten und einem hypothyreotem klinischen Zustand und zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit (Diana, Li et al. 2016, Diana, Krause et al. 2017).

### **2.3.5 Zusammenfassung**

Angesichts dieser TSH-R-Bioassay-Entwicklung bleibt festzuhalten, dass bis dato die mit einem chimären TSH-R transfektierten CHO Zellen eine hohe Sensitivität und Spezifität zeigen; insbesondere im Vergleich mit Bindungs-Immunoassays, die nicht in der Lage sind, zwischen stimulierenden und blockierenden Antikörpern zu

unterscheiden (Diana, Wuster et al. 2016). Im Laufe der Forschungsgeschichte ist es gelungen, *in vivo* durchgeführte Assays durch *in vitro*-Assays und Gewebe durch Zellkulturen zu ersetzen und auf radioaktive Isotope zu verzichten (Watson, Ajjan et al. 1998); schließlich zeigte sich die Transfektion der Zellen mit einem humanen TSH-R als bedeutender, das Prozedere vereinfachender und verkürzender Entwicklungsschritt, der gleichzeitig weniger Störanfälligkeit und eine höhere Sensitivität mit sich brachte.

### 2.4 Aktuelle Messmethoden

Als Produkt dieser jahrelangen Bioassay-Entwicklung präsentierte sich der Mc4-TSI-Bioassay als erster Luciferase-Bioassay, der nach einem von der FDA anerkannten Protokoll als Thyretain® TSI Reporter Bioassay durchgeführt wurde (Lytton, Li et al. 2010, Lytton, Ponto et al. 2010). Die Messung des Lichtsignals in diesem lytischen Assay erfolgt nach cAMP- und entsprechender Luciferase-Freisetzung in Abhängigkeit von der Höhe der TSI in relativen Lichteinheiten (Relative Light Units, RLU) im Luminometer. Um diese Ausgangsdaten zu quantifizieren, werden sie in Verhältnis zu einer bTSH-Referenzkontrolle gesetzt und als SRR% (Specimen to Reference-Ratio) angegeben, wobei der Cut-Off für die Positivität einer Patientenprobe  $\geq 140$  SRR% beträgt. Die Leistungsfähigkeit des Assays im Vergleich zu einem TBII-Bindungs-Immunoassay im Hinblick auf die TSI-Messung in MB-Patientenseren von Respondern und Non-Respondern auf thyreostatische Medikation wurde 2013 von Leschik, Diana et al. evaluiert (Leschik, Diana et al. 2013). Es zeigte sich mittels einer Verdünnungsreihe von M22, dass der Bioassay in höherem Maße in der Lage war, niedrige Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers zu erkennen und auch die polyklonalen Antikörper im Patientenserum bis zu einer geringeren Konzentration nachzuweisen. Auch bei Betrachtung der Responder und Non-Responder fiel auf, dass der TSI-Bioassay eine deutlichere Differenzierung der beiden Gruppen aufzuzeigen wusste, was einen großen Gewinn für das klinische Monitoring darstellt: Aus den Verdünnungsmessungen lässt sich die Empfehlung ableiten, den Assay in klinischen Szenarien einzusetzen, wo eine niedrige TSI-Konzentration zu erwarten ist, so etwa bei mildem, subklinischen oder neu aufgetretenem MB; ebenso, wenn die Funktionalität der Autoantikörper genauer bestimmt werden soll, so zum Beispiel bei einem Risiko für eine neonatale Hyperthyreose (Leschik, Diana et al. 2013, Kahaly, Diana et al. 2020). Von der hohen Sensitivität des Assays insbesondere für die Krankheitsaktivität und -schwere der EO wurde bereits berichtet (Lytton, Ponto et al.

2010, Ponto, Kanitz et al. 2011). Die erste Standardisierung eines Bioassays für TSI mit dem zweiten internationalen Standard (international standard, IS) 08/204 und Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Patientenprobe sowie bTSH wurde 2015 von Diana, Kanitz *et al.* durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien, die den Assay verwenden, zu gewährleisten und Follow-up-Messungen valider zu gestalten. Dazu wurden anhand einer Kalibrationskurve die SRR%-Werte in mIU/L (international units, IU) umgerechnet; so entsprach der Cut-Off von 140 SRR% einem Wert von  $9,54 \pm 1,68$  mIU/L und der lineare Bereich des Assays erstreckte sich von 5 bis 80 mIU/L (Diana, Kanitz et al. 2015).

Obwohl dieser Assay zahlreiche Vorteile wie Differenzierung von TSI und TBI, hohe Sensitivität und Spezifität besonders in Bezug auf niedrig positive Serumproben und Patienten mit extrathyroidalen Manifestationen (v. a. EO) und ein stark vereinfachtes, routinefreundliches Protokoll im Vergleich zu früheren zellbasierten Assays aufweist, ist die Messung von TRAK in Bindungs-Immunoassays doch um einiges zeitsparender, kosteneffektiver und automatisierter. Sie wird als grundsätzliche Empfehlung in den aktuellen Leitlinien zum MB empfohlen (Kahaly, Bartalena et al. 2018) und benötigt im Vergleich zum Bioassay keine Zellwachstums- und Inkubationszeit. Mehrere ausführliche Vergleiche innerhalb der Bindungs-Immunoassays wurden unternommen, ebenso eine Gegenüberstellung der Bioassays (Leschik, Diana et al. 2013, Diana, Brown et al. 2014, Diana, Wuster et al. 2016, Diana, Wuster et al. 2017, Allelein, Diana et al. 2019). Auch wenn unverdünnte Seren von den Bindungs-Immunoassays zuverlässig erkannt wurden, zeigten die Bioassays eine deutlich erhöhte Sensitivität in den Verdünnungsreihen und die Fähigkeit der Differenzierung: Daraus geht schließlich die Empfehlung hervor, Patientenproben mit erwartet niedrigen TSI-Konzentrationen, während der Schwangerschaft und post partum, während eines progressiven Verlaufs der AITD, bei Gefahr eines Wechsels von TSI zu TBI und der begleitenden Entwicklung einer HT und während der medikamentösen Behandlung des MB im Bioassay zu messen, um das klinische Management, wie etwa ein Absetzen der Medikation, besser handhaben zu können (Diana, Wuster et al. 2017, Kahaly, Bartalena et al. 2018). Eine große klinische Studie der gleichen Arbeitsgruppe, die mit Thyreostatika behandelte MB-Patienten als Responder und Non-Responder klassifizierte, zeigte einen deutlichen Abfall der TSI-Werte bei Respondern und einen Anstieg bzw. eine Stagnation der TSI-Werte im Verlauf der Behandlung bei Non-Respondern und belegt klar die Rolle der TSI-

Konzentration als prädiktiven Wert in MB-Patienten (Kahaly, Diana et al. 2020) sowie zuvor postulierte Ergebnisse (Giuliani, Cerrone et al. 2012).

Diese Ausführungen lassen also erkennen, dass Bedarf besteht, die cAMP-Assay-Entwicklung fortzuführen und die Durchführung in gewissen Bereichen zu optimieren. So stellen sich beispielsweise die Notwendigkeit einer sterilen Arbeitsbank zur Durchführung des Thyretain® TSI Bioassays und eines ausgebildeten medizinisch-technischen Angestellten sowie die lange Zellwachstumszeit von 15 - 18 h über Nacht als Hindernisse dar, die die routinemäßige Verbreitung des Assays behindern könnten. Auch die lange Inkubationszeit von 3 h nach Auftragen der Patientenserum und die zuvor erfolgte Verdünnung sowie die manuellen Waschschrte sind nicht optimal.

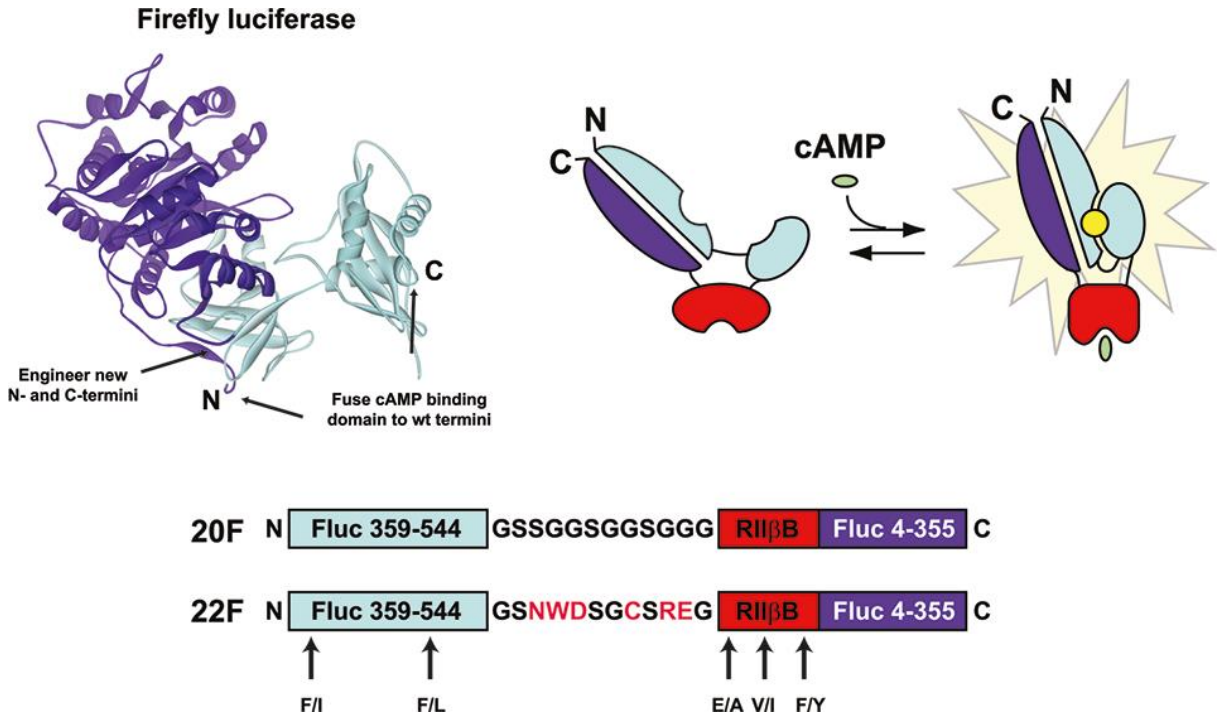
Der in dieser Arbeit vorgestellte, nicht-lytische cAMP-Assay soll eine neue, schnellere und weniger komplex durchzuführende Methode darstellen, um TSI in Patientenserum mittels einer Plasmid-Luciferase-Kopplung präzise im Luminometer zu detektieren.

### **2.5 Das GloSensor™-22F cAMP Plasmid**

Auf Basis der cAMP-basierten, G-Protein-vermittelten Reaktionskaskade konnte durch Einbringen eines Plasmids in die im Verlauf nicht lysierten Zellen eine sensitive Detektion der cAMP- und Rezeptoraktivität erreicht werden. Binkowski *et al.* verbanden in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2011 die cAMP-Bindungsdomäne der Proteinkinase A (RII $\beta$ ) mit einer zirkulären umgebenen Form der *Photinus pyralis* Luciferase in transient transfektierten HEK-293-Zellen und verglichen zwei Konstrukte, die sich in ihrer Aminosäuren-Architektur unterscheiden (Binkowski, Butler et al. 2011). Das GloSensor™-22F cAMP Plasmid, welches um fünf Aminosäuren im N-terminalen Luciferase-Fragment sowie an der cAMP-Bindungsdomäne und um sechs Aminosäuren im N-terminalen Verbindungspeptid zum GloSensor™-20F cAMP Plasmid differiert (vgl. Abb. 1), weist im Vergleich zu diesem und zu weiteren Biolumineszenz-basierten Sensoren einen vergrößerten linearen sowie dynamischen Detektionsbereich auf; zudem war es möglich, Sättigungsphänomene zu reduzieren. Des Weiteren konnte eine verbesserte Unterscheidbarkeit zwischen vollständigen und partialen Agonisten des endogenen ADRB2-Rezeptors in HEK-Zellen festgestellt werden, ebenso erwies sich das GloSensor™-22F cAMP Plasmid verglichen mit einem zeitaufgelösten Fluoreszenzassay bei Betrachtung der Sensitivität mit und ohne Zugabe eines Phosphodiesterase-Hemmers als überlegen (Binkowski, Butler et al. 2011). Besonders in diesem Zusammenhang ist die durch die Kopplung

ermöglichte Echtzeitkinetik der Signalabbildung, da cAMP-Level unmittelbar mit Rezeptor-Aktivierung oder -Deaktivierung korrelieren.

Unter diesen Voraussetzungen konnte der Assay entstehen, der Gegenstand dieser Arbeit sein soll.



**Abb. 1** Konstrukt der Plasmide GloSensor™-20F cAMP und GloSensor™-22F cAMP im Vergleich. Das GloSensor™-20F cAMP Plasmid wurde sowohl an der N-terminalen Einheit des Luciferase-Fragments als auch im Verbindungspeptid durch Veränderung von Aminosäuren modifiziert, sodass das GloSensor™-22F cAMP Plasmid entstehen konnte (Binkowski, Butler et al. 2011).



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Die im Rahmen dieser Arbeit verwandten Materialien werden in den folgenden Tab. 1 bis 5 aufgelistet.

**Tab. 1 Verwandte Chemikalien**

Cell Attachment Solution (CAS)	Quidel, Athens, Ohio, USA
GloSensor™ cAMP reagent	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Thyretain® Growth Medium (GM)	Quidel, Athens, Ohio, USA
HEPES Buffer	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
TSH-R hMAb K1-70™ (10 µg IgG mit 2,5 mg bovinem Serumalbumin/Phiole)	RSR Limited, Cardiff, Wales
TSH-R hMAb M22™ (4 µg IgG mit 2,5 mg bovinem Serumalbumin/Phiole)	RSR Limited, Cardiff, Wales
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Thyretain® Reaction Buffer (RB)	Quidel, Athens, Ohio, USA
WHO Second International Standard (IS) 08/204	National Institute for Biological Standard and Controls (NIBSC), Potters Bar, Herfordshire, England
Standards A - H	Quidel, Athens, Ohio, USA

**Tab. 2 Verwandte Verbrauchsmaterialien**

Costar® 96-well schwarze Multiwellplatte, durchsichtiger Boden	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Costar® 96-well weiße Multiwellplatte, durchsichtiger Boden	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Costar® 96-well weiße Multiwellplatte, weißer Boden	Corning Incorporated, Corning, New York, USA

### 3 Material und Methoden

Cellstar® Polypropylen-Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagenzreservoir (50 ml, 100 ml)	VistaLab™ Technologies, Brewster, New York, USA
Cellstar® Serologische Pipetten (10 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Gamma Wipe® 67 Sterile Tücher	Berkshire Corporation, Surbiton, Surrey, England
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**Tab. 3 Verwandte Geräte**

Einkanal- und Multikanalpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GloMax® 96 Microplate Luminometer	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
GloMax® Explorer Multimode Microplate Luminometer	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Immulite® 2000 XPi Immunoassay	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
Inkubator	Sanyo, Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
Inverses Mikroskop Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Orbitalschüttler	Grant Instruments, Shepreth, Cambridgeshire, England
Sunlab® digitaler Pipettierhelfer SU1700	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sicherheitswerkbank Holten Laminair	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland

**Tab. 4 Verwandte Kits**

GloSensor™ cAMP Assay	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Thyretain® TSI Reporter BioAssay	Quidel, Athens, Ohio, USA

**Tab. 5 Verwandte Zelllinien**

pGloSensor™-22F cAMP Plasmid	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA Quidel, Athens, Ohio, USA
FreshFrozenCells® CHO Mc4 cells	Quidel, Athens, Ohio, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Funktionsweise des GloSensor™ cAMP-Assays

Der neuartige GloSensor™ (GS) cAMP-Assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) macht sich die cAMP-Signalkaskade zunutze, die durch Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors in Gang gesetzt wird. Die cAMP-Bindungsdomänen sind mit einem Plasmid als Biosensor verbunden, der schließlich durch Konformationsänderungen die Expression von *Luciferase* induziert und cAMP-abhängig die Lumineszenz-Messung im Luminometer erlaubt. Voraussetzung ist die Equilibrierung mit dem GS cAMP Reagenz, bevor die entsprechenden zu messenden Komponenten auftragen werden. In den in dieser Arbeit angeführten Versuchen liegen den Messungen CHO Zellen zugrunde, die mit dem Plasmid 22F und dem TSH-Rezeptor stabil transfektiert wurden. Weitere Details zu Materialien und der Struktur des Plasmids können dem Herstellerprotokoll entnommen werden (GS cAMP Assay Technical Manual TM 076, überarbeitet: Januar 2019, Link: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/glosensor-camp-assay-protocol.pdf?la=en>).

### 3.2.2 Optimierungsschritte

#### 3.2.2.1 Allgemeine Protokollmodifikation

Das Assay-Protokoll des Herstellers sieht für bereits gelöste und im Anschluss adhärent wachsende CHO Zellen und der Durchführung in einer weißen 96-well-Platte mit durchsichtigem Boden folgende Schritte vor:

#### *Zellpräparation (Tag 1)*

Zunächst werden 10 ml eines auf 37 °C vorgewärmten Wachstumsmediums in ein Gefäß gegeben. Die Zellsuspension ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml) wird dem Medium unter Aspirieren und Resuspendieren der Lösung hinzugefügt. In der Folge werden jeweils 100 µl pro Well auf eine mit Gewebekultur vorbehandelte 96-well-Platte aufgetragen. Diese soll nun bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % über Nacht inkubieren.

#### *Equilibrierung und Stimulation (Tag 2)*

Am Folgetag wird nun das Medium vorsichtig mithilfe einer Pipette aus den einzelnen Wells entfernt, sodass nur noch der angewachsene Zelllayer übrigbleibt. Kurz darauf werden je 100 µl der Equilibrierungslösung, die die 6%-ige GS cAMP Stock Solution

enthält, in die Wells pipettiert und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die gewünschten Komponenten inklusive Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen, wobei das Volumen von der Molarität der Stock Solution abhängt.

#### *Lumineszenz-Messung (Tag 3)*

Empfohlen wird eine Lumineszenz-Messung im Luminometer (GloMax® Explorer, Promega) bei Raumtemperatur und auch bereits vor Zugabe der Stimulantien und direkt danach.

Das Versuchsprotokoll unseres Labors, das dem ersten Experiment mit dem neuen Assay und den bereits mit 22F und TSH-Rezeptor transfektierten CHO Zellen zugrunde lag, wies bereits einige Veränderungen zum Herstellerprotokoll auf, da sich die Zelllinien in ihrer Signalgebung in Abhängigkeit der Protokollschritte stark unterscheiden.

#### *Zellpräparation (Tag 1)*

Von dem im Wasserbad (37 °C) vorgewärmten Wachstumsmedium (GM, Thyretain®, Quidel, Athens, Ohio, USA) wurden 6 ml in einen Falcon pipettiert. Die inneren 60 Wells der 96-well-Platte (schwarz mit durchsichtigem Boden) wurden mittels einer Multikanalpipette mit jeweils 100 µl einer Zelladhäsionslösung (CAS, Thyretain®, Quidel, Athens, Ohio, USA) ausgefüllt, zwischen 1 und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die CAS-Lösung anschließend verworfen. Währenddessen wurde eine Phiole der GS CHO Zellen ( $3,5 \times 10^6$  Zellen/Röhrchen, 1 Röhrchen pro Platte) für 2 bis 4 min im Wasserbad aufgetaut und ihr gesamter Inhalt dem GM mit einer sterilen Pipette zugegeben, wobei auf ausreichendes, dreimaliges Aspirieren und Ausstoßen und Invertieren des Falcons zu achten war, um ausreichende Durchmischung zu garantieren. Nach dem Überführen in ein steriles Reagenzreservoir wurden den 60 Wells jeweils 100 µl der Zellsuspension zugegeben und die Platte inkubierte 18 h über Nacht im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

#### *Herstellung der Equilibrierungslösung (Tag 2)*

Zunächst war es notwendig, die cAMP Reagenz Stocklösung herzustellen. Dafür wurde aus einer HEPES Buffer Stocklösung (1 M, 0,5 ml) mittels demineralisiertem Wasser (49,5 ml) eine HEPES Buffer Arbeitslösung (10 mM, 50 ml) geschaffen. Davon

wurden 8,17 ml einem Falcon mit 250 mg des GS cAMP Reagenz zugegeben und schließlich bei -80 °C gelagert.

Für jedes Experiment musste die Equilibrierungslösung in Abhängigkeit von der zu messenden Plattenanzahl angesetzt werden; für 60 Wells einer Platte wurden 6,5 ml benötigt. Um diese Menge herzustellen, wurden 6,11 ml des Reaktionspuffers (RB, Thyretain®, Quidel, Athens, Ohio, USA) mit 390 µl der GS cAMP Reagenz Stock Solution angereichert und vermischt, sodass das Reagenz eine 6 %-ige Konzentration aufwies.

#### *Equilibrierung und Stimulation (Tag 2)*

Nach Ablauf der 18 h konnte am nächsten Tag das Medium in den Wells verworfen werden. Der angewachsene Zelloberfläche in den Wells wurde mit je 100 µl des 6%-igen GS cAMP Reagenz equilibriert. Im Anschluss erfolgte der Auftrag von 10 µl der zu messenden Proben, bevor die Platte für 1 h erneut im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) platziert wurde.

#### *Lumineszenz-Messung (Tag 2)*

Nach Ablauf dieser Zeit inkubierte die Platte noch einige Zeit bei Raumtemperatur, bevor im Abstand von 10 min in einem Zeitfenster von 10 bis 60 min im Luminometer ihr Lumineszenz-Signal gemessen wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass dieser Versuchsansatz im Vergleich zum Herstellerprotokoll mit einer höheren Zelldichte arbeitete, die Proben vor und nicht nach der Inkubation aufgetragen wurden, die Inkubationszeit 1 h statt 2 h betrug und die Inkubation größtenteils in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) anstatt bei Raumtemperatur stattfand. Grundsätzlich jedoch orientierte sich der Versuchsansatz am Inhalt des Herstellerprotokolls.

Die folgende Tabelle, an die sich genauere Beschreibungen der optimierten Parameter anschließen, zeigt den chronologischen Entwicklungsweg über 9 Versuchsansätze, wobei die rot gefüllten Zellen die Veränderungen zum vorhergehenden Versuchsansatz hervorheben. Dabei bildet Versuchsansatz I, der in diesem Kapitel beschrieben wurde, die Grundlage. Im Methodenteil wird bei jeder Versuchsauswertung angegeben, in welchem Stadium (I - IX) sich die Entwicklung des Assays zu diesem Zeitpunkt befand.

Tab. 6 Übersichtstabelle Optimierungsparameter (Teil I)

Optimierungsparameter	I	II	III	IV	V	VI
Zellpräparation	6 ml GM + 1 Phiole Zellen (je $3,5 \times 10^6$ Zellen)	6 ml GM + 1 Phiole Zellen (je $3,5 \times 10^6$ Zellen)	6 ml GM + 1 Phiole Zellen (je $3,5 \times 10^6$ Zellen)	5 ml GM + 2 Phiolen Zellen (je $3,5 \times 10^6$ Zellen)	5 ml GM + 2 Phiolen Zellen (je $3,5 \times 10^6$ Zellen)	6 ml des <b>6% GS</b> <b>Reagenz</b> in RB + 1 Phiole Zellen (je $7 \times 10^6$ Zellen)
96-well-Platte	Schwarze Platte, durchsichtiger Boden	Schwarze Platte, durchsichtiger Boden	Schwarze Platte, durchsichtiger Boden	Schwarze Platte, durchsichtiger Boden	Schwarze Platte, durchsichtiger Boden	Schwarze Platte, durchsichtiger Boden
Zellwachstumszeit	Über Nacht (ON, 18 h) bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	Über Nacht (ON, 18 h) bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	Über Nacht (ON, 18 h) bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	2 h, 3 h bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	2 h bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	keine
Probenvolumen/ Suspensionsvolumen	10 µl/100 µl	1, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 µl/100 µl Orbitalschüttler	10 µl/100 µl Orbitalschüttler	10 µl/100 µl Orbitalschüttler	10 µl/100 µl Orbitalschüttler	10 µl/100 µl
Inkubationszeit und -bedingungen	1h, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	1h, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	1h, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	1h, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	1 h, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	1 h + 2 h, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>
Plattenmesszeitpunkte	10 - 60 min RT, alle 10 min	10 - 60 min RT, alle 10 min	10 - 60 min RT, alle 10 min + 120 min RT	10 - 60 min RT, alle 10 min	10 - 60 min RT, alle 10 min	10 - 60 min RT, alle 10 min
Kontrollen und Standards	Kontrollen: Thyretain, Quidel, Athens, Ohio, USA	Kontrollen: Thyretain, Quidel, Athens, Ohio, USA	Kontrollen: Thyretain, Quidel, Athens, Ohio, USA	Kontrollen: Thyretain, Quidel, Athens, Ohio, USA	Kontrollen: Thyretain, Quidel, Athens, Ohio, USA	Referenzkontrolle: Neue GS Referenzkontrolle in RB + NS

Tab. 6 Übersichtstabelle Optimierungsparameter (Teil II)

Optimierungsparameter	VII	VIII	IX
Zellpräparation	6 ml des 6% GS Reagenz in RB + 1 Phiolen Zellen (je 7 x 10 <sup>6</sup> Zellen)	6 ml des 6% GS Reagenz in RB + 1 Phiolen Zellen (je 7 x 10 <sup>6</sup> Zellen)	6 ml des 6% GS Reagenz in RB + 1 Phiolen Zellen (je 7 x 10 <sup>6</sup> Zellen)
96-well-Platte	Weißer Platte, durchsichtiger Boden	Weißer Platte, durchsichtiger Boden	Weißer Platte, weißer Boden
Zellwachstumszeit	keine	keine	keine
Probenvolumen/ Suspensionsvolumen	10 µl/100 µl	10 µl/100 µl	5 µl/50 µl
Inkubationszeit und -bedingungen	1 h, 90 min RT 1 h 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , dann 0/10/30 min RT	1 h, 90 min RT 1 h 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , dann 0-30 min RT	35 min RT
Plattenmesszeitpunkte	60 - 90 min RT, alle 10 min	60 - 90 min RT, alle 10 min	35 - 65 min RT, alle 5 min
Kontrollen und Standards	Referenzkontrolle: Neue GS Referenzkontrolle in RB + NS	Referenzkontrolle: Neue GS Referenzkontrolle in NS	Kontrollen und Standards: Quidel, Athens, Ohio, USA

### 3.2.2.2 Zellpräparation

Wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, wurden die Zellen in einer Anzahl von 3,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Platte zunächst in 6 ml GM gelöst. Im Laufe der Versuchsreihe wurde die Menge des GM auf 5 ml herabgesetzt, die Zellanzahl jedoch durch die Verwendung von zwei Phiolen mit dem gleichen Inhalt von 3,5 x 10<sup>6</sup> Zellen erhöht. Als man sich entschloss, das Zellwachstum in den Platten zu verlassen (s. Kapitel 3.2.2.4), wurde dementsprechend auch kein GM mehr benötigt und die Zellen wurden direkt mit dem GS cAMP Reagenz vermischt und aufgetragen. Wo vorher zwei Phiolen notwendig waren, wurde die Gesamtmenge von 7 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer Phiolen produziert und verwandt, sodass es bei der direkten Vermischung der 7 x 10<sup>6</sup> Zellen mit dem GS cAMP Reagenz als Suspension und Equilibrierungsmedium blieb.

### 3.2.2.3 Verwendung von 96-well-Platten

Begonnen wurde die Versuchsreihe mit einer schwarzen 96-well-Platte mit durchsichtigem Boden, die anschließend von einer weißen 96-well-Platte mit



durchsichtigem Boden ersetzt wurde. Im Laufe der Versuchsreihe wurden auch einige Experimente mit einer weißen Platte mit undurchsichtigem weißem Boden durchgeführt.

In den Versuchsansätzen I - VIII wurden nur die inneren 60 Wells befüllt, ab Versuchsansatz IX schließlich alle 96 Wells.

#### **3.2.2.4 Zellwachstumszeit**

Zunächst ließ man den Zellen einen Zeitraum von 18 h über Nacht, um sie mithilfe von GM an den mit CAS präparierten Plattenboden im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) anwachsen zu lassen. Anschließend konnte die Wachstumszeit erst auf 3 h, dann auf 2 h reduziert werden. Letztendlich wurde die Suspension aus Zellen und GS cAMP Reagenz (s. Kapitel 3.2.2.2) zum gleichen Zeitpunkt wie die Probe hinzugegeben und die Zellwachstumszeit konnte gänzlich wegfallen.

#### **3.2.2.5 Probenvolumen/Suspensionsvolumen**

Bereits zu Beginn wurde ein Volumen von 10 µl der Probe mit 100 µl der Suspension verwandt, obwohl in der Folge verschiedene andere Volumina insbesondere von Patientenproben (1, 2,5, 5, 20, 30, 40 µl) ausprobiert wurden und zusätzlich ein Orbitalschüttler eingesetzt wurde. Zuletzt konnte die Menge auf 5 µl der Probe und 50 µl der Suspension reduziert werden.

Während in den Versuchsansätzen I - VIII die Suspension vor der Probe aufgetragen wurde, wurde die Reihenfolge ab Versuchsansatz IX umgekehrt und die Probe somit zuerst auf den unpräparierten Plattenboden gegeben, bevor die Suspension im Anschluss mit einer Multikanalpipette hinzugefügt wurde.

#### **3.2.2.6 Inkubationszeit und -bedingungen**

Die Inkubation von Suspension und zu messenden Proben erfolgte zunächst für 1 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), bevor die Platte danach für eine kurze Zeit an die Raumtemperatur gewöhnt und dann im Luminometer gemessen wurde. Zwischenzeitlich wurde die Platte für 2 h im Inkubator gelassen. Schließlich wurde in Versuchsansatz VII getestet, wie sich die Resultate bei Inkubation bei Raumtemperatur (1 h und 90 min) im Vergleich zu Inkubation im Inkubator (1 h) und im Anschluss noch bei Raumtemperatur (0/10/30 min) verhielten, um die Notwendigkeit eines Inkubators zu überprüfen. Ab Versuchsansatz IX konnten die Experimente bei Raumtemperatur mit einer Inkubationszeit von 35 min erfolgen.

### **3.2.2.7 Plattenmesszeitpunkte**

Anfänglich wurde die Platte im Abstand von 10 min für 60 min nach Ablauf der Inkubationszeit im Luminometer gemessen, in Versuchsansatz III auch einmal nach 120 min. Ab Versuchsansatz VII wurde dann ab Inkubationsminute 60 regelmäßig alle 10 min im Luminometer gemessen, bis 90 min erreicht waren. Als die Platte ausschließlich bei Raumtemperatur inkubiert wurde (s. Kapitel 3.2.2.6), wurde die Platte über einen Zeitraum von 90 min (VII, VIII) in einem Abstand von 10 min bzw. 35 - 65 min (IX) in einem Abstand von 5 min gemessen.

### **3.2.2.8 Kontrollen und Standards**

Die Positiv-, Referenz- und Negativkontrollen wurden für die ersten Versuchsansätze dem Thyretain® TSI Reporter Bioassay Kit (Quidel, Athens, Ohio, USA) entnommen, bis schließlich eine eigene GS Referenzkontrolle (Quidel, Athens, Ohio, USA) eingeführt wurde, deren Funktionalität in den Verdünnungsmedien RB und Normalserum (NS) (2 mIU/ml bTSH in NS) getestet wurde, wobei sich letztere durchsetzte. Voraussetzung zur Verwendung des NS war TSI- und TBI-Negativität bei euthyreoter Stoffwechsellage. Die ab Versuchsansatz IX verwandten Kontrollen und Standards, deren Konzentrationen in Tab. 20 aufgeführt sind, wurden ebenfalls von Quidel, Athens, Ohio, USA produziert.

### 3.2.3 Auswertung der Lichtsignale

Die Lumineszenz-Messung der TSI-Aktivität wurde bis Versuchsansatz VIII mit dem GloMax® 96 Microplate Luminometer und ab Versuchsansatz IX mit dem GloMax® Explorer Multimode Microplate Luminometer durchgeführt.

Die Ausgabe der Rohdaten durch den Luminometer erfolgte in Relativen Lichteinheiten (RLU). Je nach Versuch wurden Duplikate, Triplikate oder eine höhere Anzahl an Replikaten ausgewertet, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

Eine dagegen errechnete Einheit ist das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (S/B Ratio). Je nach Verdünnungsmedium (RB, NS) wird der Faktor errechnet, um den der RLU-Wert der Probe den RLU-Wert des reinen Verdünnungsmediums (Hintergrund) übersteigt:

$$S/B \text{ Ratio} = \frac{\bar{X} \text{ RLU Probe}}{\bar{X} \text{ RLU Hintergrund}}$$

Äquivalent zum Thyretain® TSI Bioassay wurde die Höhe einer Probenmessung in Verhältnis zur Referenzkontrolle gesetzt (vgl. Kapitel 3.2.2.8), was als Percentage of specimen-to-reference ratio (SRR%) angegeben wird und eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb der Platte schaffen soll:

$$SRR\% = \frac{\bar{X} \text{ RLU Probe}}{\bar{X} \text{ RLU Referenzkontrolle}} \times 100$$

Um den Faktor des Unterschieds eines Messwerts (z. B. einer Patientenprobe) im Vergleich zu einem Normwert (z. B. NS) zu errechnen, wurde die faktorielle Zunahme (Fold Increase) verwandt:

$$\text{Fold Increase} = \frac{\bar{X} \text{ RLU Probe}}{\bar{X} \text{ RLU Normwert}}$$












### 3.2.4 Stimulation mit monoklonalen Antikörpern: M22, K1-70

#### 3.2.4.1 Testung von M22 in verschiedenen Verdünnungsmedien: RB vs. NS

Der Versuch wurde nach Versuchsansatz I durchgeführt.

Aus einer Stocklösung von 2 µg/ml M22 in PBS wurden nach folgendem Verdünnungsschema Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers M22 von 400 ng/ml bis 0,39 ng/ml sowohl mit NS als auch mit RB als Verdünnungsmedium hergestellt. Diese wurden in Duplikaten mit jeweils einer Probe reinem NS und reinem RB auf die Platte aufgetragen.

Das NS wurde von einem euthyreoten gesunden Probanden gewonnen.

<b>400 ng/ml</b>		100 µl ( <b>M22 2 µg/ml</b> ) + 400 µl <b>NS</b> oder <b>RB</b>
<b>200 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>100 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>50 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>25 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>12,5 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>6,25 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>3,125 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>1,56 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>0,78 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>
<b>0,39 ng/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/RB</b>

**Abb. 2 Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von M22 in den Konzentrationen von 400 ng/ml bis 0,39 ng/ml in NS und RB.** Zu Beginn wurden der in PBS gelösten M22 Stock Solution von 2 µg/ml 400 µl des Verdünnungsmediums hinzugegeben. Um die weiteren verdünnten Konzentrationen zu gewinnen, wurden der vorherigen Konzentration je 250 µl entnommen und erneut 250 µl des Verdünnungsmediums hinzugefügt, bis die niedrigste Konzentration von 0,39 ng/ml erreicht war.

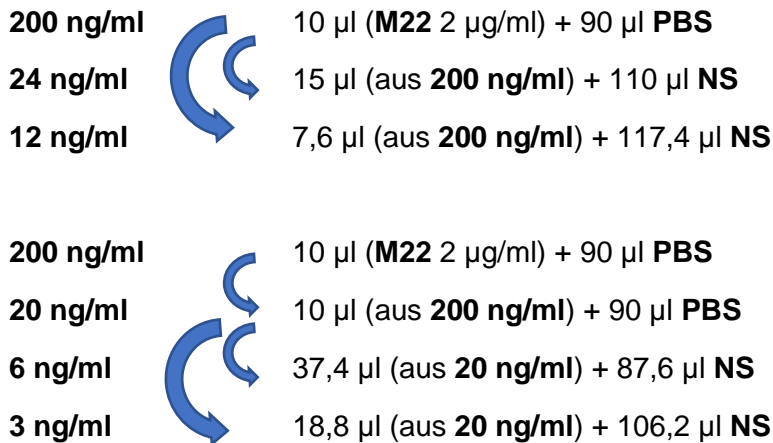
#### 3.2.4.2 Blockade der stimulierenden Aktivität von M22 durch K1-70

Die Versuche wurden nach Versuchsansatz III durchgeführt.

Aus einer Stocklösung von erneut 2 µg/ml des stimulierenden monoklonalen Antikörper M22 bzw. des blockierenden monoklonalen Antikörpers K1-70 in PBS wurden nach folgenden Schemata Verdünnungsreihen für beide Antikörper in NS erstellt.

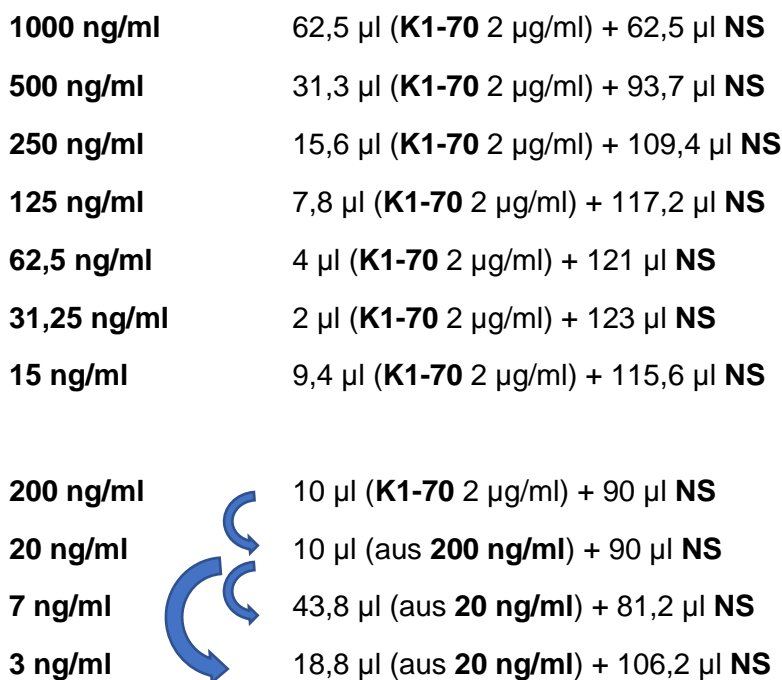
Das NS wurde von einem euthyreoten gesunden Probanden gewonnen.

M22 wurde in Konzentrationen von 200 bis 3 ng/ml in NS verdünnt:



**Abb. 3 Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von M22 in den Konzentrationen von 200 ng/ml bis 3 ng/ml in NS.** Als Ausgangspunkt diente die M22 Stock Solution (2 µg/ml), der für eine Verdünnung von 1:10 90 µl PBS zugefügt wurden. Aus dieser Konzentration von 200 ng/ml konnten alle weiteren Konzentrationen gewonnen werden, teilweise über eine 1:100 Verdünnung (20 ng/ml), die auch über Zugabe von PBS erreicht wurde.

K1-70 wurde in Konzentrationen von 1000 bis 3 ng/ml in NS verdünnt:



**Abb. 4 Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von K1-70 in den Konzentrationen von 1000 ng/ml bis 3 ng/ml in NS.** Als Ausgangspunkt diente die K1-70 Stock Solution (2 µg/ml), die in den weiteren Verdünnungsschritten verwandt wurde. Um stets das gleiche Volumen von 125 µl erhalten, erhöhte sich in jedem Verdünnungsschritt mit Abnahme der Stock Solution-Menge das zugegebene Volumen an NS. Die Konzentrationen 7 ng/ml und 3 ng/ml wurden über eine 1:100 Verdünnung (20 ng/ml) gewonnen.

In einem ersten Versuch wurden die K1-70-Konzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,25 ng/ml mit den M22-Konzentrationen 24, 12, 6 und 3 ng/ml gemischt, sodass jede Konzentration an K1-70 mit jeder Konzentration von M22 auf der Platte gemessen

werden konnte. Der Auftrag jeder Mischkonzentration erfolgte in Duplikaten. Zusätzlich wurden die Antikörper jeweils in ihrer Stock Solution auf der Platte mitgemessen.

In einem zweiten Versuch wurden die K1-70-Konzentrationen 500, 250, 31,25, 15, 7 und 3 ng/ml mit den M22-Konzentrationen 12 und 6 ng/ml gemischt, wobei hier die Verdünnung ebenfalls mit NS erfolgte. Jede Konzentration von K1-70 traf mit jeder Konzentration von M22 zusammen; der Auftrag erfolgte in Duplikaten. Zusätzlich wurde M22 als Stock Solution sowie als reine Konzentration (12 und 6 ng/ml) auf der Platte mitgemessen.

In der Auswertung der Aktivitäten der monoklonalen Antikörper wurde die Hemmfähigkeit des blockierenden Antikörpers in % Inhibition angegeben:


















$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\bar{X} \text{ RLU reiner Agonist} - \bar{X} \text{ RLU Mischung aus Agonist und Antagonist})}{\bar{X} \text{ RLU reiner Agonist}} \times 100$$

### 3.2.4.3 Testung von M22 mit verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen

Die Versuche wurden nach den Versuchsansätzen VI und VII durchgeführt.

Aus einer Stocklösung von 1,67 mg/ml M22 in PBS wurden nach folgendem Verdünnungsschema Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers M22 von 200 ng/ml bis 0,195 ng/ml mit NS als Verdünnungsmedium hergestellt. Diese wurden in Triplikaten auf die Platte aufgetragen.

Das NS wurde von einem euthyreoten gesunden Probanden gewonnen.

1 mg/ml		60 µl (M22 1,67 mg/ml) + 40 µl PBS
0,01 mg/ml		10 µl + 990 µl NS
200 ng/ml		10 µl + 490 µl NS
100 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
50 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
25 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
12.5 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
6.25 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
3.125 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
1.56 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0.78 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0.39 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0,195 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0,1 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0,05 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0,025 ng/ml		250 µl + 250 µl NS
0,0125 ng/ml		250 µl + 250 µl NS

**Abb. 5 Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von M22 in den Konzentrationen von 200 ng/ml bis 0,0125 ng/ml in NS.** Zu Beginn wurden der in PBS gelösten M22 Stock Solution von 1,67 mg/ml 40 µl PBS hinzugegeben und diese mit 990 µl NS auf ein Hundertstel verdünnt. Um die weiteren verdünnten Konzentrationen zu gewinnen, wurden der vorherigen Konzentration einmalig 10 µl und in der Folge je 250 µl entnommen und einmalig 490 µl und in der Folge je 250 µl des NS als Verdünnungsmedium hinzugefügt, bis die niedrigste Konzentration von 0,0125 ng/ml erreicht war.

### 3.2.5 Stimulation mit Patientenseren und euthyreoten Kontrollen

#### 3.2.5.1 Patientenkollektiv und Auswahl der Patientenproben

Die Funktionalität des Assays wurde durch die Messung von NS aus euthyreoten, gesunden Probanden und Patientenseren aus MB-Patienten getestet, die entsprechend den aktuellen Leitlinien diagnostiziert wurden (Kahaly, Bartalena et al. 2018).

Die Patientenseren wurden anhand der Messwerte in SRR% aus dem Thyretain® TSI Bioassay in drei Gruppen eingeteilt, wobei eine Patientenprobe ab einem Wert von > 140 SRR% als positiv gewertet wurde:

**Tab. 7 Einteilung der Patientenseren in SRR%-Bereiche anhand Thyretain® TSI Bioassay**

<b>Klassifizierung</b>	<b>TSI-Bereich Thyretain®</b>
<b>Niedrig TSI-pos.</b>	140 - 279 SRR%
<b>Moderat TSI-pos.</b>	280 - 420 SRR%
<b>Hoch-TSI-pos.</b>	> 420 SRR%

Für Informationen zur Durchführung des Thyretain® TSI Bioassay wird auf das Herstellerprotokoll (Quidel, Athens, Ohio, USA) verwiesen.

In den folgenden Kapiteln gibt jeweils eine Übersichtstabelle Auskunft über die in diesem Experiment verwandten NS- und Patientenproben.

#### 3.2.5.2 Verdünnung einer hochpositiven TSI-Serumprobe










Der Versuch wurde nach Versuchsansatz I durchgeführt.

**Tab. 8 Verwendung von Seren: Verdünnung einer hochpositiven TSI-Serumprobe**

<b>Klassifizierung (Anzahl)</b>	<b>TSI-Werte Thyretain®</b>
<b>Hoch-TSI-pos. (n = 1)</b>	714 SRR%

Die hochpositive TSI-Patientenprobe wurde nach folgendem Schema mit verdünntem NS von einer Konzentration von 1:11 bis zu einer Konzentration von 1:2816 verdünnt und in Triplikaten auf der Platte gemessen:



<b>1:11</b>		0,1 ml ( <b>Serumprobe</b> ) + 1 ml <b>RB</b>
<b>1:22</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:44</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:88</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:176</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:352</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:704</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:1408</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>
<b>1:2816</b>		0,5 ml + 0,5 ml <b>NS (1:11)</b>

**Abb. 6 Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe einer hochpositiven MB-Patientenprobe in NS (1:11).** Zu Beginn wurden 0,1 ml der unverdünnten Serumprobe 1 ml RB hinzugegeben. Um die weiteren Verdünnungen zu gewinnen, wurden der vorherigen Verdünnung je 0,5 ml entnommen und erneut 0,5 ml eines 1:11 verdünnten NS hinzugefügt, bis eine Verdünnung von 1:2816 erreicht war.

Anschließend wurden die erhaltenen Messwerte mit denen aus dem Thyretain® TSI Bioassay der gleichen Patientenprobe in den identischen Verdünnungsschritten verglichen.

### 3.2.5.3 Testung verschiedener Volumina niedrig, moderat und hochpositiver TSI-Serumproben

Die Versuche wurden nach Versuchsansatz II durchgeführt.

In einem ersten Versuch wurden je eine moderat und hochpositive TSI-Probe in den Volumina 1, 2,5, 5, 10, 20, 30 und 40 µl in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

**Tab. 9 Verwendung von Seren: Testung verschiedener Volumina niedrig-, moderat und hochpositiver TSI-Serumproben (I)**

<b>Klassifizierung (Anzahl)</b>	<b>TSI-Werte Thyretain®</b>
<b>Moderat TSI-pos. (n = 1)</b>	252 SRR%
<b>Hoch-TSI-pos. (n = 1)</b>	524 SRR%

In einem zweiten Versuch wurden weitere niedrig, moderat und hochpositive TSI-Proben in den Volumina 1, 5 und 10 µl in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

**Tab. 10 Verwendung von Seren: Testung verschiedener Volumina niedrig, moderat und hochpositiver TSI-Serumproben (II)**

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
Niedrig TSI-pos. (n = 1)	167 SRR%
Moderat TSI-pos. (n = 1)	336 SRR%
Hoch-TSI-pos. (n = 2)	608 SRR%, 554 SRR%

**3.2.5.4 Testung klinischer Proben in Duplikaten**

Der Versuch wurde nach Versuchsansatz I durchgeführt.

Im Versuch wurden diverse NS, niedrig, moderat und hochpositive TSI-Proben in Duplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

**Tab. 11 Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben in Duplikaten**

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
TSI-neg. Kontrollen (NS) (n = 5)	< 140 SRR%
Niedrig TSI-pos. (n = 7)	155 - 252 SRR%
Moderat TSI-pos. (n = 6)	283 - 418 SRR%
Hoch-TSI-pos. (n = 7)	462 - 714 SRR%

**3.2.5.5 Testung klinischer Proben zum Vergleich von 3 Zellwachstumszeiten: ON, 3 h, 2 h**

Der Versuch wurde nach Versuchsansatz IV (2 h und 3 h Zellwachstumszeit) durchgeführt. Der ON-Versuch entspricht Kapitel 3.2.5.4.

Im Versuch wurden diverse NS, niedrig, moderat und hochpositive TSI-Proben in Duplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen. Die verwandten Seren entsprechen jenen aus Kapitel 3.2.5.4.

**3.2.5.6 Testung klinischer Proben in 18 Replikaten**

Der Versuch wurde nach Versuchsansatz V durchgeführt.

Im Versuch wurden je ein NS sowie je eine niedrig und moderat positive TSI-Probe in 18 Replikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

Tab. 12 Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben in 18 Replikaten

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
TSI-neg. Kontrollen (NS) (n = 1)	< 140 SRR%
Niedrig TSI-pos. (n = 1)	155 SRR%
Moderat TSI-pos. (n = 1)	283 SRR%

### 3.2.5.7 Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen: Inkubator vs. RT

Der erste Versuch wurde nach Versuchsansatz VI durchgeführt (**Inkubation über 1 h vs. 2 h im Inkubator**).

Im Versuch wurden je ein NS sowie je eine niedrig, moderat und hochpositive TSI-Probe in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

Tab. 13 Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (I)

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
TSI-neg. Kontrollen (NS) (n = 1)	< 140 SRR%
Niedrig TSI-pos. (n = 1)	155 SRR%
Moderat TSI-pos. (n = 1)	367 SRR%
Hoch-TSI-pos. (n = 1)	462 SRR%

Der zweite Versuch wurde nach Versuchsansatz VII durchgeführt (**Inkubation über 60 min im Inkubator + 30 min RT vs. 60 min RT**).

Im Versuch wurden je ein NS sowie je eine niedrig, moderat und hochpositive TSI-Probe in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

Tab. 14 Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (II)

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
TSI-neg. Kontrollen (NS) (n = 1)	< 140 SRR%
Niedrig TSI-pos. (n = 1)	198 SRR%
Moderat TSI-pos. (n = 1)	305 SRR%
Hoch-TSI-pos. (n = 1)	555 SRR%

Der dritte Versuch wurde nach Versuchsansatz VII durchgeführt (**Inkubation über 60 min im Inkubator + 0/10/30 min RT vs. 60/90 min RT**).

Im Versuch wurden diverse NS und niedrig, moderat und hochpositive Proben in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

**Tab. 15 Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (III)**

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
<b>TSI-neg. Kontrollen (NS) (n = 4)</b>	< 140 SRR%
<b>Niedrig TSI-pos. (n = 4)</b>	198 - 271 SRR%
<b>Moderat TSI-pos. (n = 5)</b>	305 - 404 SRR%

Der vierte Versuch wurde nach Versuchsansatz VIII durchgeführt (**Inkubation über 60 min im Inkubator + 0 - 30 min RT vs. 60 - 90 min RT**).

Im Versuch wurden diverse NS und niedrig, moderat und hochpositive TSI-Proben in Duplikaten auf die Platte aufgetragen und gemessen.

**Tab. 16 Verwendung von Seren: Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen (IV)**

Klassifizierung (Anzahl)	TSI-Werte Thyretain®
<b>TSI-neg. Kontrollen (NS) (n = 9)</b>	< 140 SRR%
<b>Niedrig TSI-pos. (n = 9)</b>	142 - 263 SRR%
<b>Moderat TSI-pos. (n = 5)</b>	193 - 310 SRR%
<b>Hoch-TSI-pos. (n = 5)</b>	481 - 956 SRR%

Außerdem erfolgte ein Vergleich mit einem anderen Labor.

### **3.2.6 Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204)**

Die Versuche wurden nach Versuchsansatz IX durchgeführt.








Um die Konvertierung der Daten in internationale Einheiten pro Liter (IU/L) zu ermöglichen, wurden 28 Multiwell-Platten an fünf Tagen gemessen, auf denen vier verschiedene Panels an Verdünnungen des internationalen Standards 08/204 (IS) der WHO (3 x mit NS, 1 x mit PBS verdünnt) sowie drei Serumpanels (SP) à 16 Proben



mit je acht TSI-positiven und acht TSI-negativen Seren gemessen und unterschiedlich kombiniert wurden, dazu je acht ausgewählte Standards, die dem linearen Bereich entsprechen. Die Messungen wurden nach folgendem Schema vorgenommen:

**Tab. 17 Versuchsübersicht der Messung von 28 Platten mit 4 IS-Panels (A - D) und 3 Serumpanels (je 16 Proben mit je 8 TSI-pos. und je 8 TSI-neg. Proben) in Kombination**

Serumpanels	Plattenummerierung mit Angabe der Serum- und IS-Panels				Tag des Versuchs
<b>SP1-Serie</b>	P1-SP1-A	P10-SP1-A	P19-SP1-B	P28-SP1-A	4
<b>SP1-Serie</b>	P2-SP1-B	P11-SP1-B	P24-SP1-D		2
<b>SP1-Serie</b>	P3-SP1-D	P18-SP1-A	P27-SP1-C		1
<b>SP2-Serie</b>	P4-SP2-B	P12-SP2-B	P20-SP2-B		3
<b>SP2-Serie</b>	P5-SP2-C	P13-SP2-C	P21-SP2-C		5
<b>SP2-Serie</b>	P6-SP2-D	P14-SP2-D	P25-SP2-A		4
<b>SP3-Serie</b>	P7-SP3-A	P15-SP3-A	P22-SP3-A		5
<b>SP3-Serie</b>	P8-SP3-C	P16-SP3-C	P23-SP3-C		2
<b>SP3-Serie</b>	P9-SP3-D	P17-SP3-D	P26-SP3-B		3

Zur Herstellung der vier Panels der IS-Verdünnungen in zwölf Konzentrationen wurde für die Panels A - C für jedes Panel 10 x 2 ml NS aus TSI-negativen (negativ im Thyretain® TSI Reporter Bioassay und Siemens Immulite® TSI Assay) Proben gepoolt und als Verdünnungsmedium für folgendes Schema verwandt. Diese insgesamt 30 NS wurden aus einer Gruppe von 60 NS anhand ihrer niedrigeren Werte in den beiden Assays ausgewählt und randomisiert auf die Panels verteilt. Für Panel D wurde stattdessen PBS genutzt.

<b>113 mIU/ml</b>		<b>IS 08/204 Stock Solution</b>
<b>15 mIU/ml</b>		200 µl + 1300 µl <b>NS/PBS</b>
<b>9 mIU/ml</b>		40 µl + 460 µl <b>NS/PBS</b>
<b>7,5 mIU/ml</b>		250 µl + 250 µl <b>NS/PBS</b>
<b>6 mIU/ml</b>		400 µl + 600 µl <b>NS/PBS</b>
<b>2 mIU/ml</b>		333 µl + 667 µl <b>NS/PBS</b>
<b>1 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>
<b>0,5 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>
<b>0,25 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>
<b>0,125 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>

<b>0,063 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>
<b>0,031 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>
<b>0,0156 mIU/ml</b>		500 µl + 500 µl <b>NS/PBS</b>

**Abb. 7 Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe des IS 08/204 in den Konzentrationen von 113 mIU/ml bis 0,0156 mIU/ml in NS und PBS.** Als Ausgangspunkt der Verdünnung diente der IS in einer Konzentration von 113 mIU/ml; aus dieser wurden die Verdünnungen 15 mIU/ml und 9 mIU/ml hergestellt, wobei 15 mIU/ml wiederum als Basis für die Verdünnungen 7,5 mIU/ml und 6 mIU/ml diente. Die folgenden Verdünnungen konnten der jeweils vorausgehenden entnommen werden. Es wurden entsprechende Mengen an NS oder PBS hinzugegeben.

Die drei Serumpanels enthielten je 16 Proben, davon je acht TSI-positive Patientenseren und acht TSI-negative Kontrollen, die zu Beginn randomisiert auf die Panels aufgeteilt wurden. In der Summe wurden also je 24 positive und negative Seren gemessen. Zur Bestimmung der TSI wurden sowohl das Thyretain® TSI Bioassay als auch das Siemens Immulite® TSI Assay verwandt. Ebenso wie das Thyretain® TSI Bioassay wurde das Siemens Immulite® TSI Assay nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die positiven Patientenproben wurden nochmals entsprechend dem Siemens Immulite®-Ergebnis in niedrig-, moderat und hochpositiv eingeteilt. Ab einem Wert von > 0,55 IU/L wird das Ergebnis als positiv gewertet:

**Tab. 18 Einteilung der Patientenseren in IU/L-Bereiche nach Siemens Immulite® TSI Assay (I)**

<b>Klassifizierung</b>	<b>Ergebnisbereich Siemens Immulite®</b>
<b>Niedrig pos.</b>	0,55 - 4 IU/L
<b>Moderat pos.</b>	4 - 10 IU/L
<b>Hoch-pos.</b>	> 11 IU/L

Einen Überblick über die verwandten Seren gibt folgende Tabelle, wobei die Einteilung ausschließlich anhand der Siemens Immulite®-Ergebnisse erfolgte:

**Tab. 19 Verwendung von Seren: Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204)**

<b>Klassifizierung</b>	<b>Ergebnisse Siemens Immulite®</b>	<b>TSI-Werte Thyretain®</b>
<b>Negative Kontrollen (NS) (n = 24)</b>	< 0,55 IU/L	< 140 SRR%
<b>Niedrig pos. (n = 8)</b>	0,553 - 2,73 IU/L	245 - 352 SRR%
<b>Moderat pos. (n = 8)</b>	4,11 - 9,33 IU/L	335 - 566 SRR%
<b>Hoch-pos. (n = 8)</b>	12,1 - 40 IU/L	345 - 523 SRR%

Zusätzlich wurden auf jeder der 28 Platten acht ausgewählte M22-Standardkonzentrationen gemessen:

**Tab. 20 Verwandte Standardkonzentrationen A - H in IU/L**

<b>Standard</b>	<b>IU/L</b>
<b>H</b>	12,1
<b>G</b>	10
<b>F</b>	7,41
<b>A3</b>	2,79
<b>C</b>	0,33
<b>E</b>	0,058
<b>A2</b>	0,03
<b>Std A0</b>	0,01

Die WHO-Konzentrationen, Standards und Kontrollen (Hochpositiv, niedrigstpositiv, negativ, Blank) wurden in Duplikaten, die Patientenseren dagegen in Triplikaten gemessen.

### 3.2.7 Testung von Sensitivität und Spezifität

Die Versuche wurden nach Versuchsansatz IX durchgeführt.

Um die Sensitivität und Spezifität des Assays genauer zu untersuchen, wurden 17 Platten mit insgesamt 226 TSI-positiven (positiv im Thyretain® TSI Bioassay und Siemens Immulite® TSI Assay) und 176 TSI-negativen (negativ im Thyretain® TSI Bioassay und Siemens Immulite® TSI Assay) Proben gemessen.

Die positiven Patientenproben wurden nochmals entsprechend dem Siemens Immulite®-Ergebnis in niedrig, moderat, hoch- und sehr hoch positiv eingeteilt. Ab einem Wert von > 0,55 IU/L wird das Ergebnis als positiv gewertet:

**Tab. 21 Einteilung der Patientenseren in IU/L-Bereiche nach Siemens Immulite® TSI Assay (II)**

<b>Klassifizierung</b>	<b>Ergebnisbereich Siemens Immulite®</b>
<b>Niedrig pos.</b>	0,55 - 4 IU/L
<b>Moderat pos.</b>	4 - 10 IU/L
<b>Hoch-pos.</b>	10 - 20 IU/L
<b>Sehr hoch pos.</b>	> 20 IU/L

Einen Überblick über die verwandten Seren gibt folgende Tabelle, wobei die Einteilung ausschließlich anhand der Siemens Immulite®-Ergebnisse erfolgte:

**Tab. 22 Verwendung von Seren: Testung von Sensitivität und Spezifität**

<b>Klassifizierung</b>	<b>Ergebnisse Siemens Immulite®</b>	<b>TSI-Werte Thyretain®</b>
<b>Negative Kontrollen (NS) (n = 176)</b>	< 0,55 IU/L	< 140 SRR%
<b>Niedrig pos. (n = 79)</b>	0,568 - 3,93 IU/L	402 - 942 SRR%
<b>Moderat pos. (n = 56)</b>	4,06 - 9,39 IU/L	241 - 1018 SRR%
<b>Hoch-pos. (n = 41)</b>	10,1 - 19,3 IU/L	298 - 958 SRR%
<b>Sehr hoch pos. (n = 50)</b>	21,2 - >40 IU/L	395 - 1090 SRR%

Die Standards (s. Tab. 20) und Kontrollen (Hochpositiv, niedrigstpositiv, negativ) wurden in Duplikaten, die Patientenseren dagegen in Triplikaten gemessen.

### 3.2.8 Verwendung von Graphen

Die Ergebnisauswertung der mAK-Stimulation sowie der Patientenproben und Kontrollen wurde mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.04, San Diego, CA, USA vorgenommen. Entsprechend der US-amerikanischen Schreibweise entspricht der Punkt vor den Dezimalstellen dem deutschen Komma.

Tabellen wurden sowohl mit Microsoft® Word® als auch mit Microsoft® Excel® erstellt.

Für die Ergebnisauswertung der Standardisierung und der Daten zu Sensitivität und Spezifität wurde die Statistik-Software R verwendet.



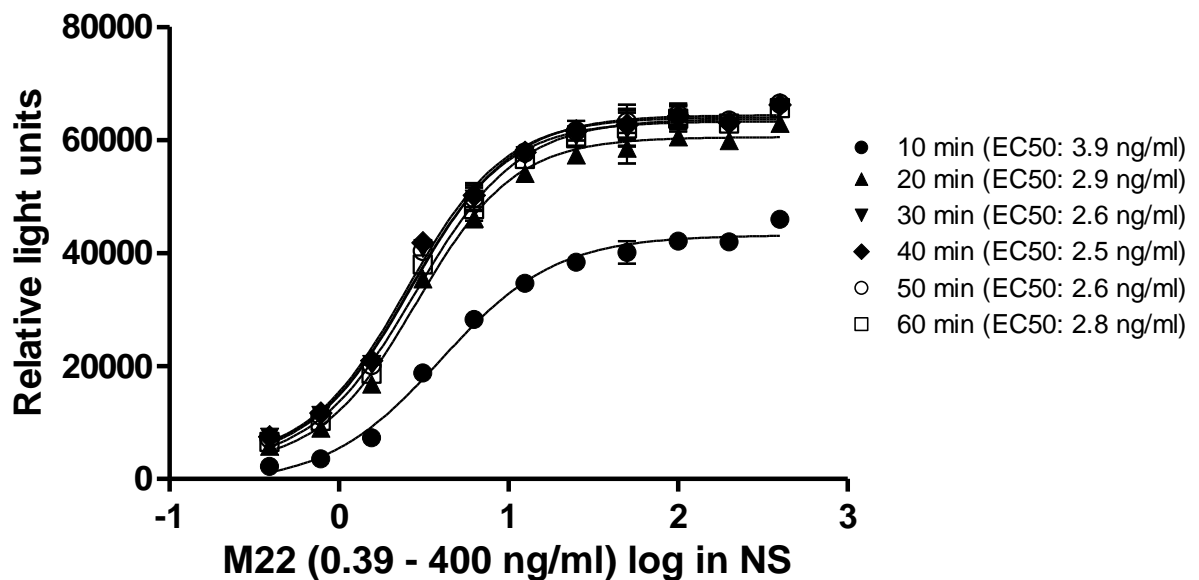
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stimulation mit monoklonalen Antikörpern: M22, K1-70

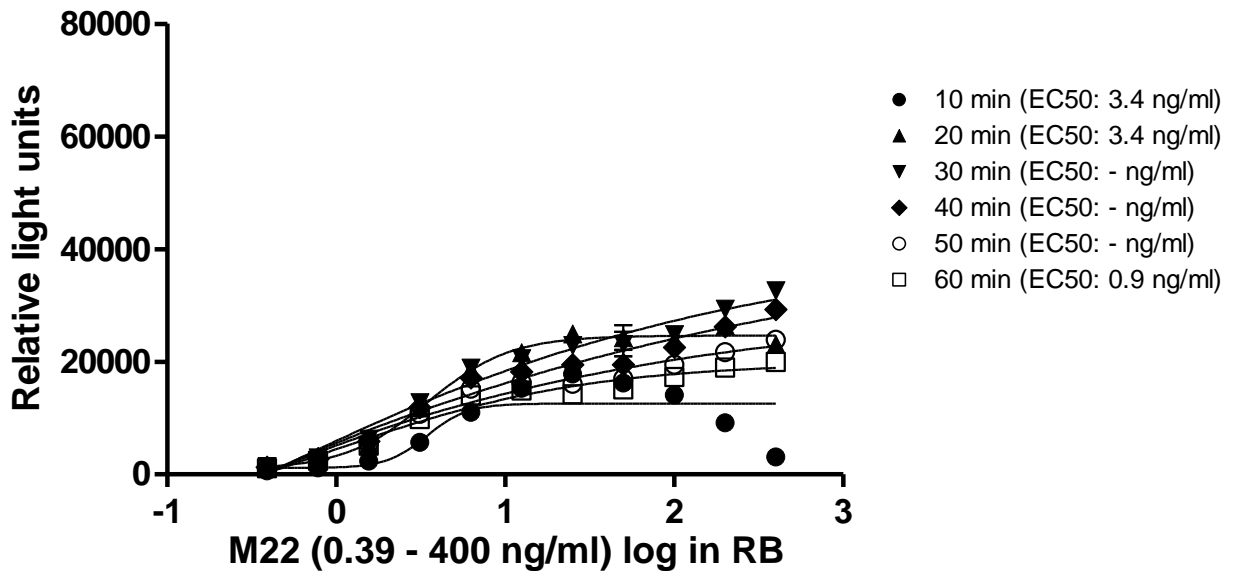
#### 4.1.1 Testung von M22 in verschiedenen Verdünnungsmedien: Reaktionspuffer (RB) vs. Normalserum (NS)

Wie in Kapitel 3.2.4.1 aufgezeigt, sollten Verdünnungen von M22 in den Konzentrationen von 0,39 - 400 ng/ml in den Verdünnungsmedien NS und RB miteinander verglichen werden.

In den Abb. 8 und 9 sind jeweils die Dosis-Wirkungskurven für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min Messzeit in RLU gezeigt.

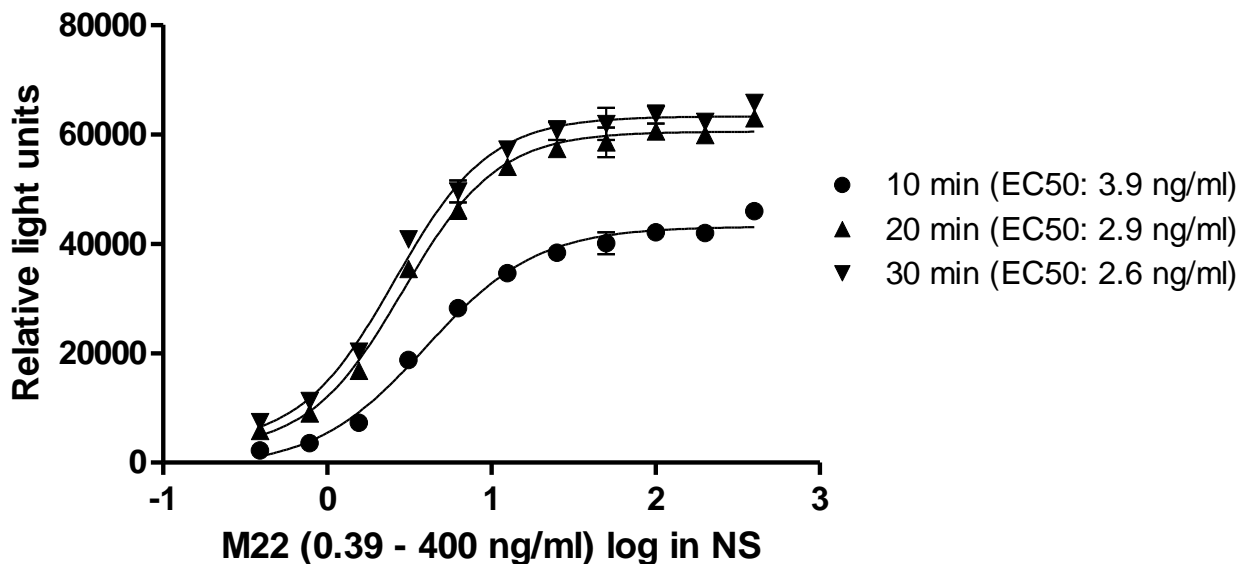


**Abb. 8 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC<sub>50</sub>, 10 - 60 min.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 9 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in RB und EC<sub>50</sub>, 10 - 60 min.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

Um die Kurven besser differenzieren zu können, bietet sich die Darstellung in den beiden Gruppen 10 - 30 min und 40 - 60 min für die Verdünnung in NS (Abb. 10 und 11) und RB (Abb. 12 und 13) an.



**Abb. 10 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC<sub>50</sub>, 10 - 30 min.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

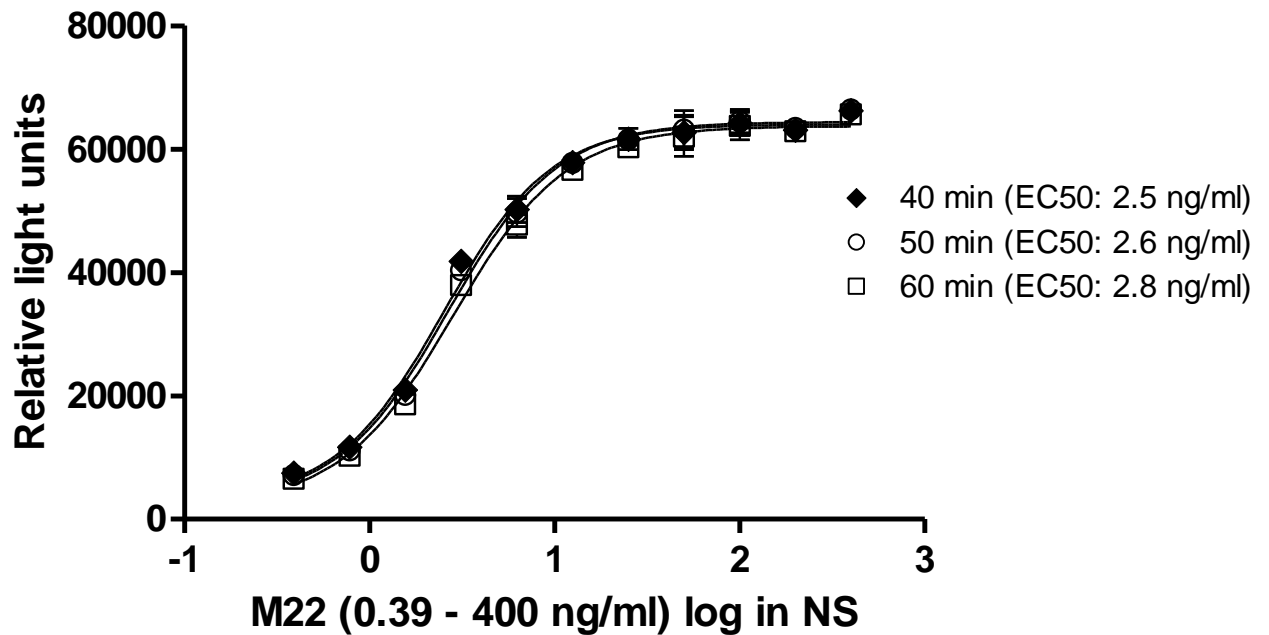


Abb. 11 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und  $EC_{50}$ , 40 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

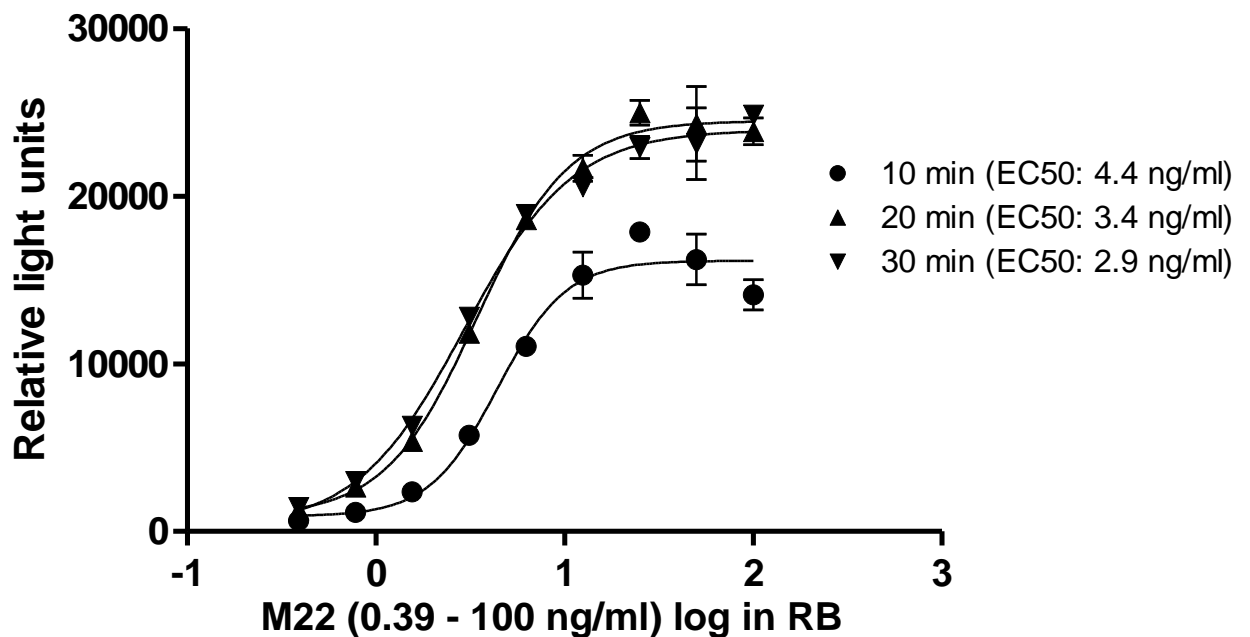


Abb. 12 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 100 ng/ml in RB und  $EC_{50}$ , 10 - 30 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

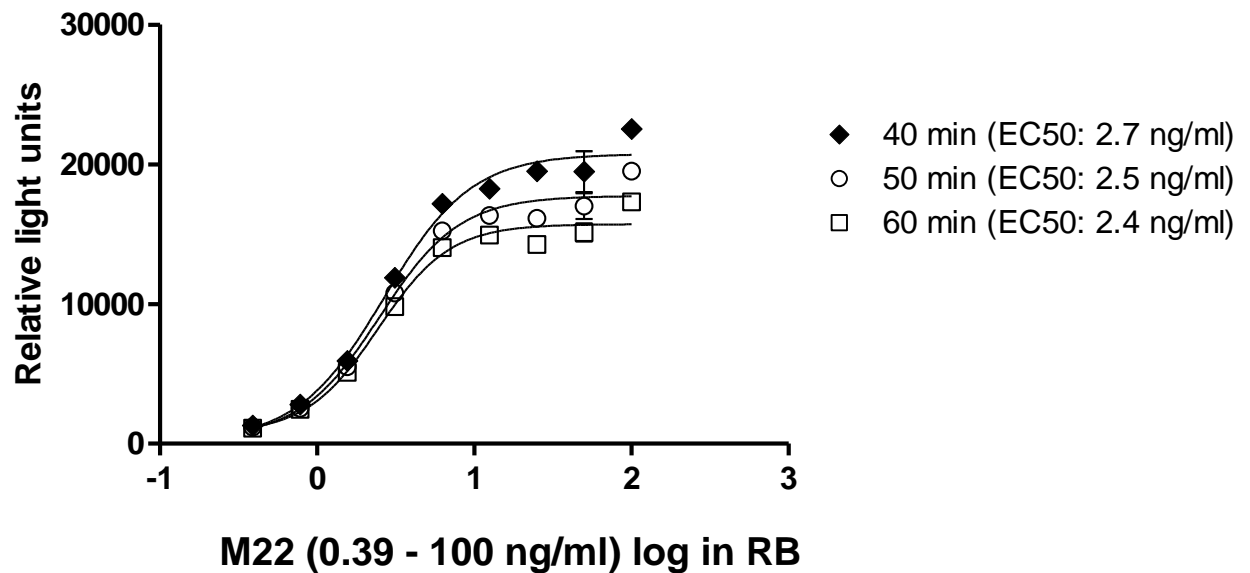


Abb. 13 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 100 ng/ml in RB und EC<sub>50</sub>, 40 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

Um den Verlauf der Lichtsignalveränderung in Abhängigkeit von dem mit auf der Platte gemessenen Hintergrund nachvollziehen zu können, folgt eine Darstellung des S/B Ratio (vgl. Kapitel 3.2.3). In diesem Falle ist der Hintergrund als 100  $\mu$ l des Equilibrierungsmediums (6 % GS cAMP Reagenz verdünnt in RB) mit 10  $\mu$ l NS bzw. RB definiert. Grundlage der Berechnung bildet der Mittelwert aus den gemessenen Duplikaten.

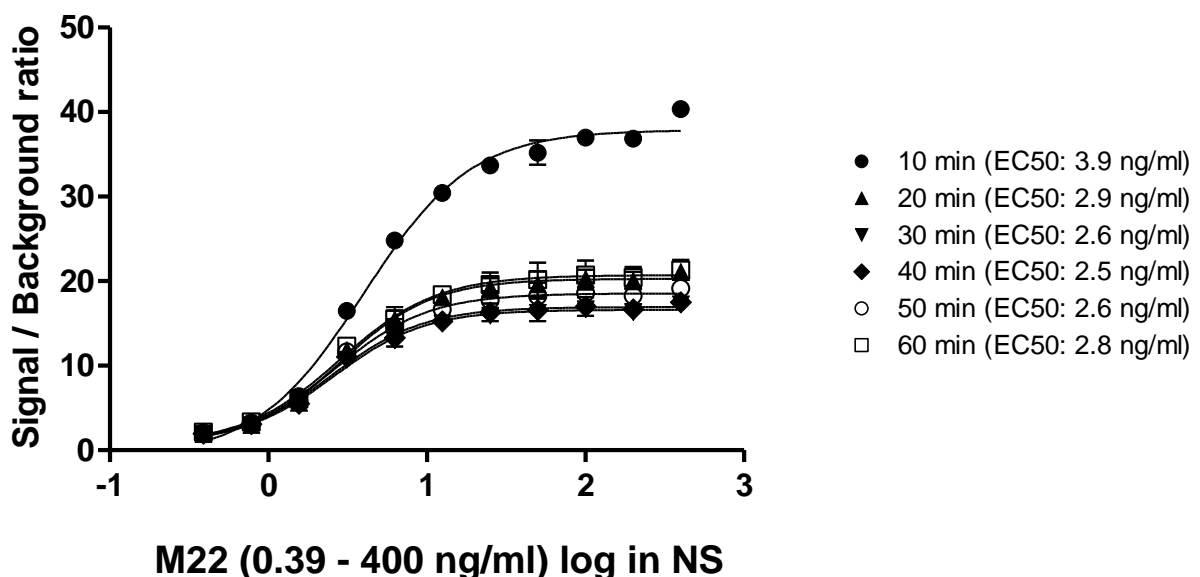
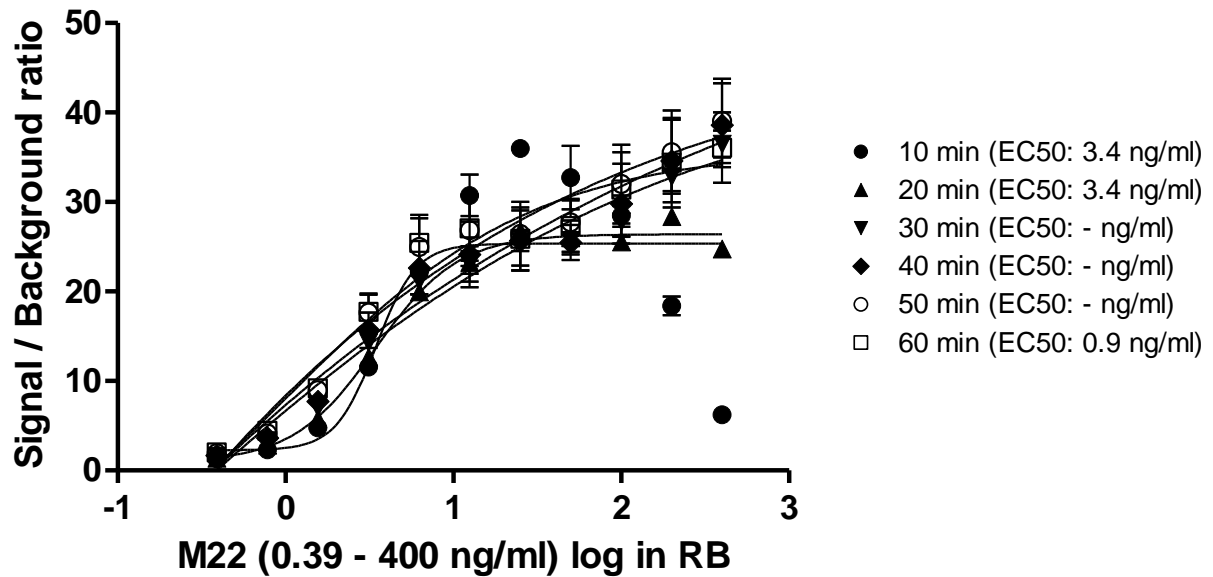


Abb. 14 S/B Ratio nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in NS und EC<sub>50</sub>, 10 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse das S/B Ratio, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist. Die Rechnung erfolgte mit einem Hintergrund von 100  $\mu$ l des Equilibrierungsmediums (6 % GS cAMP Reagenz verdünnt in RB) mit 10  $\mu$ l NS.

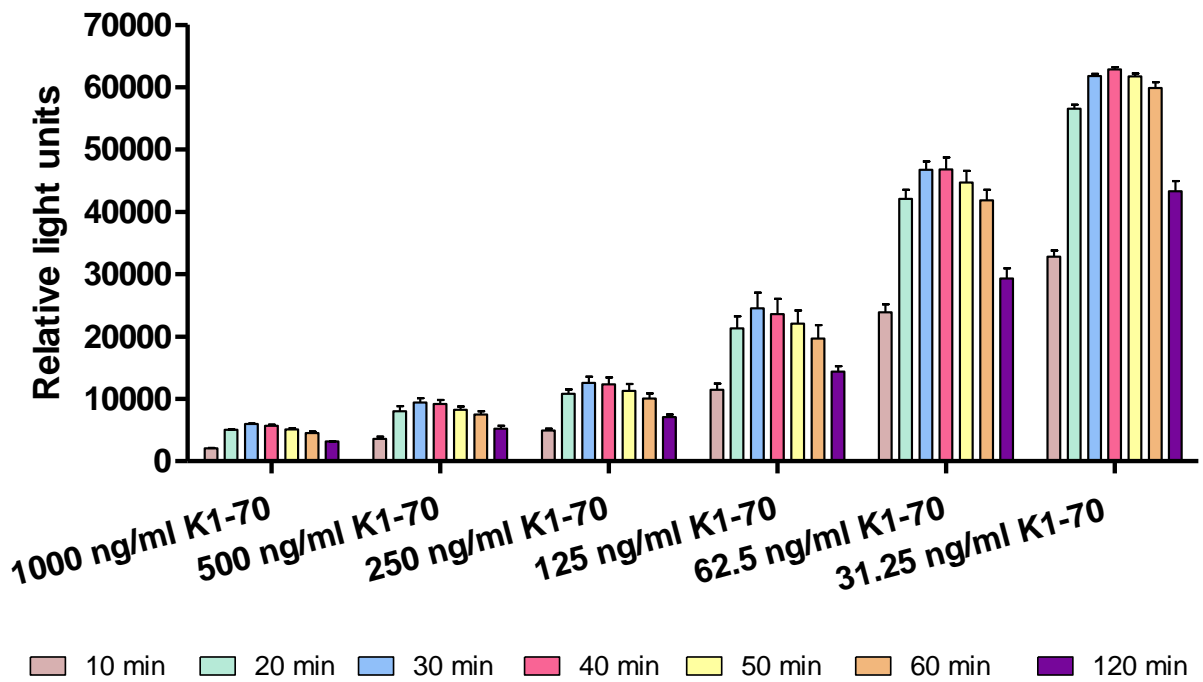


**Abb. 15 S/B Ratio nach Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,39 bis 400 ng/ml in RB und EC<sub>50</sub>, 10 - 60 min.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse das S/B Ratio, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist. Die Rechnung erfolgte mit einem Hintergrund von 100  $\mu$ l des Equilibrierungsmediums (6 % GS cAMP Reagenz verdünnt in RB) mit 10  $\mu$ l RB.

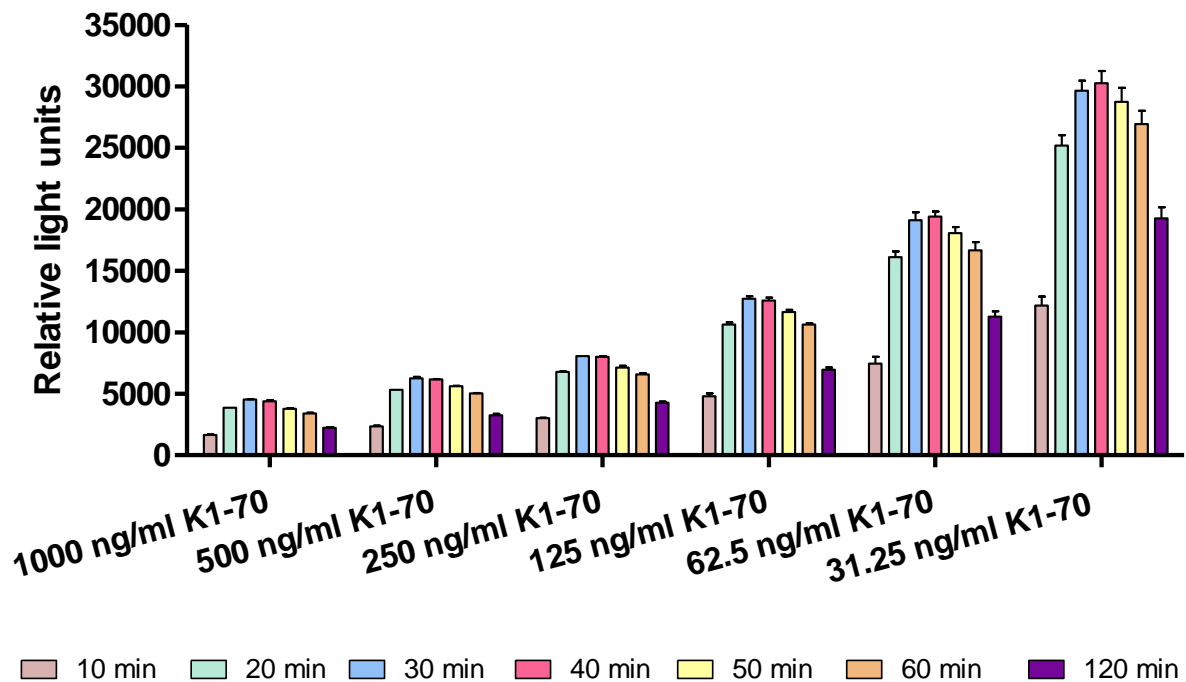
#### 4.1.2 Blockade der stimulierenden Aktivität von M22 durch K1-70

Wie bereits in Kapitel 3.2.4.2 ausgeführt, wurden in einem ersten Versuch sechs K1-70-Konzentrationen (1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,25 ng/ml) mit vier fixen M22-Konzentrationen (24, 12, 6 und 3 ng/ml) kombiniert, um die verbleibende Aktivität der Stimulation zu messen. Die Verdünnung wurde mit NS vorgenommen.

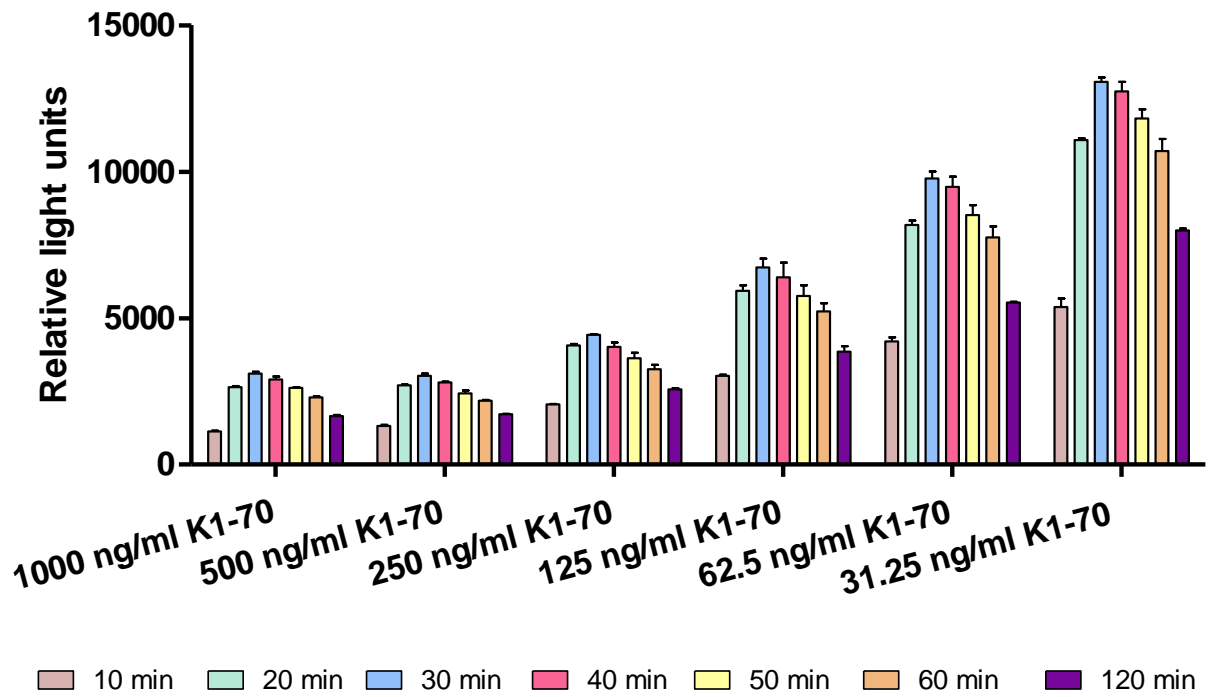
Die Abb. 16, 17, 18 und 19 zeigen die mittleren Messwerte der Stimulation in Duplikaten zu den Messzeitpunkten 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 120 min, geordnet nach absteigender M22-Konzentration.



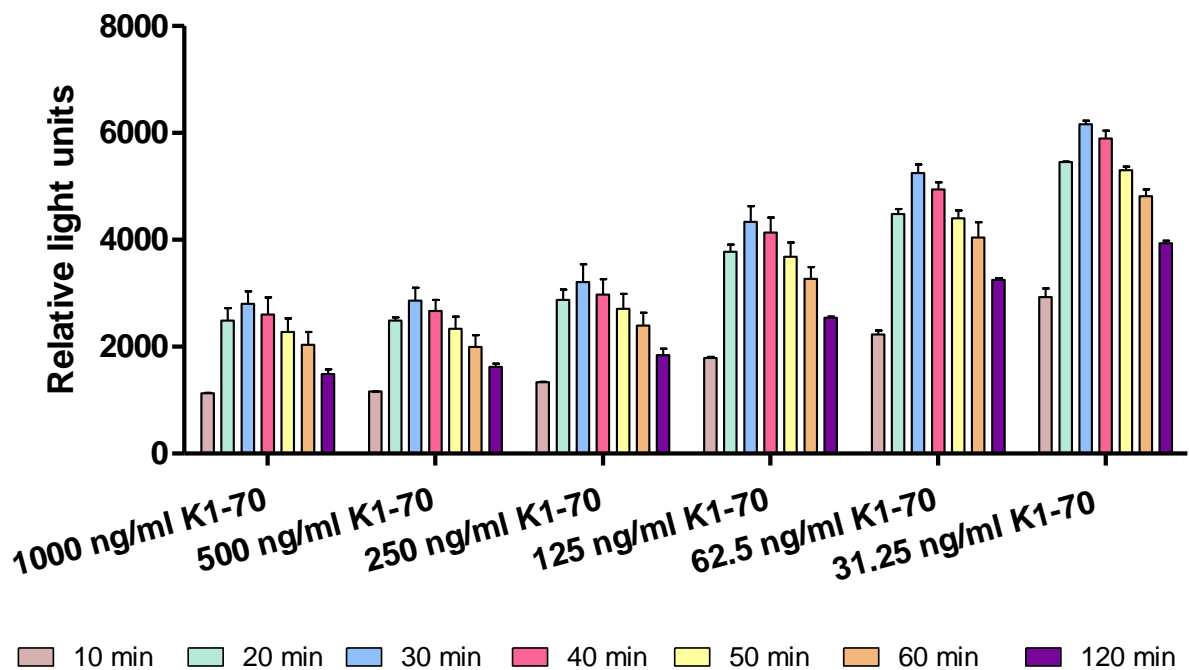
**Abb. 16 RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 24 ng/ml.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 24 ng/ml kombiniert wurden. Gemessen wurde zu 7 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min). Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 17 RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml kombiniert wurden. Gemessen wurde zu 7 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min). Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



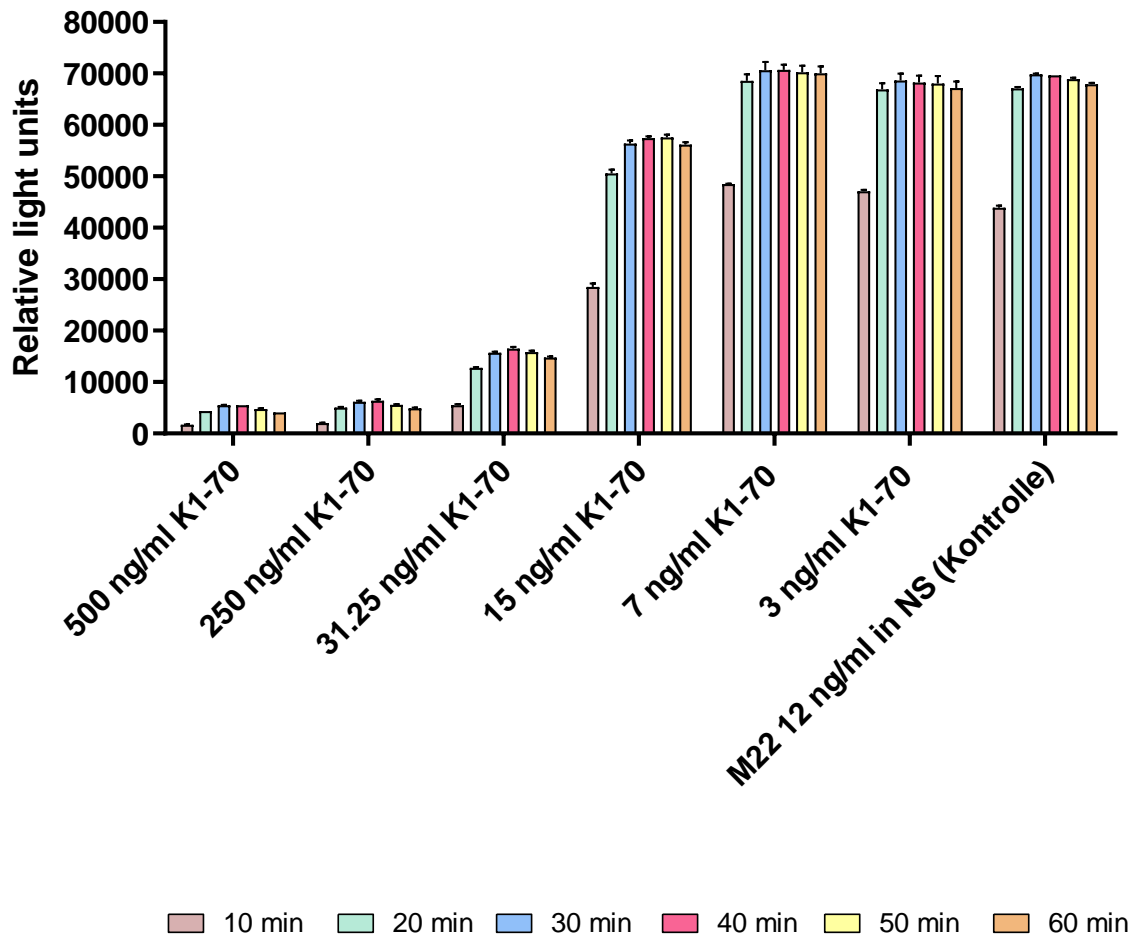
**Abb. 18 RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml kombiniert wurden. Gemessen wurde zu 7 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min). Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 19 RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (31.25 - 1000 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 3 ng/ml.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 3 ng/ml kombiniert wurden. Gemessen wurde zu 7 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min). Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

In einem zweiten Versuch wurden erneut sechs K1-70-Konzentrationen (500, 250, 31, 25, 15, 7 und 3 ng/ml) mit zwei M22-Konzentrationen (12 und 6 ng/ml) gemischt, wobei hier die Verdünnung ebenfalls mit NS erfolgte.

Abb. 20 zeigt die mittleren Messwerte der Stimulation in Duplikaten zu den Messzeitpunkten 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min für die M22-Konzentration von 12 ng/ml.

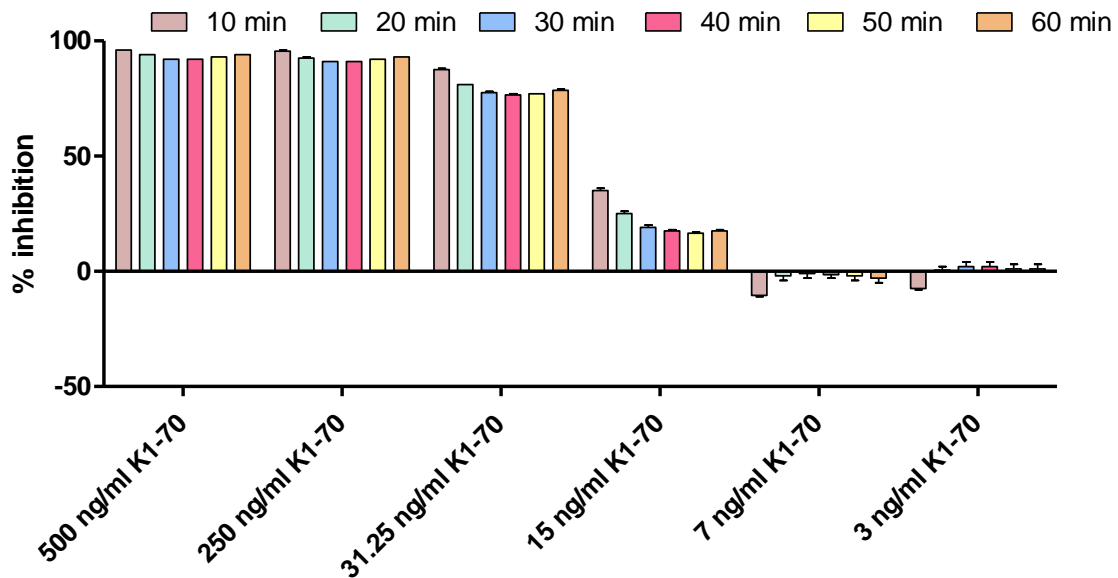


**Abb. 20 RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (3 - 500 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml und Kontrolle.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml kombiniert wurden. Außerdem wurde die nicht blockierte Aktivität der M22-Konzentration von 12 ng/ml als Kontrolle gemessen. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

Die nach der in Kapitel 3.2.4.2 erläuterten Formel berechnete Inhibition in % für eine M22-Konzentration von 12 ng/ml durch K1-70 ist in Abb. 21 dargestellt:

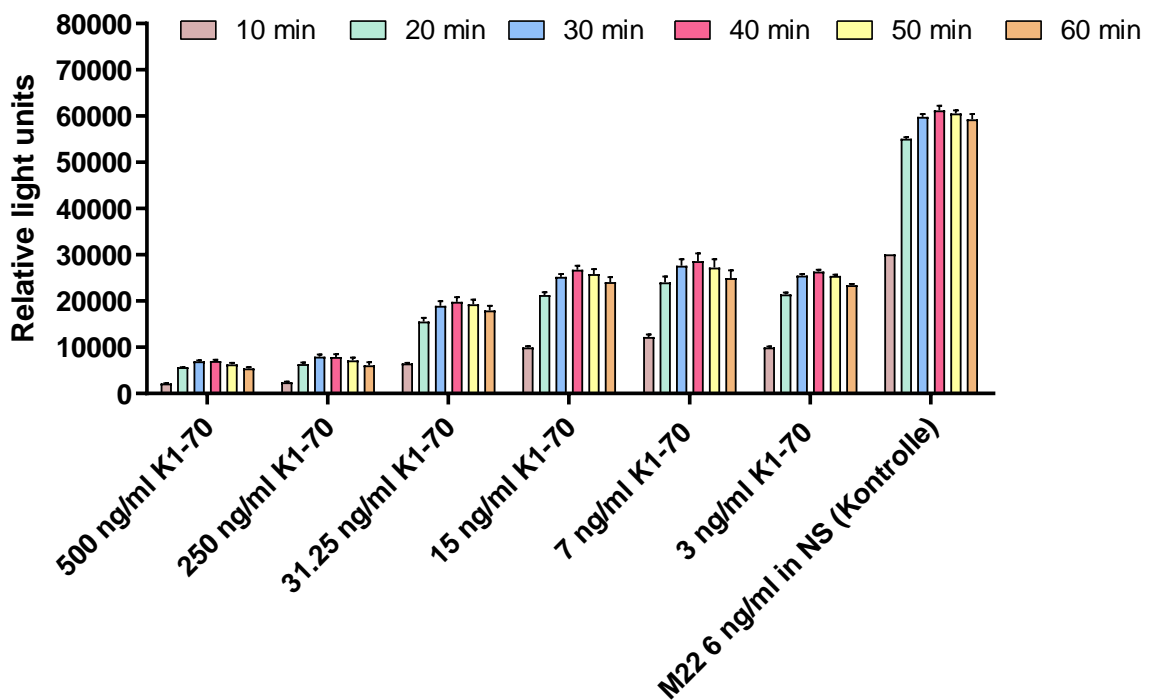


#### 4 Ergebnisse

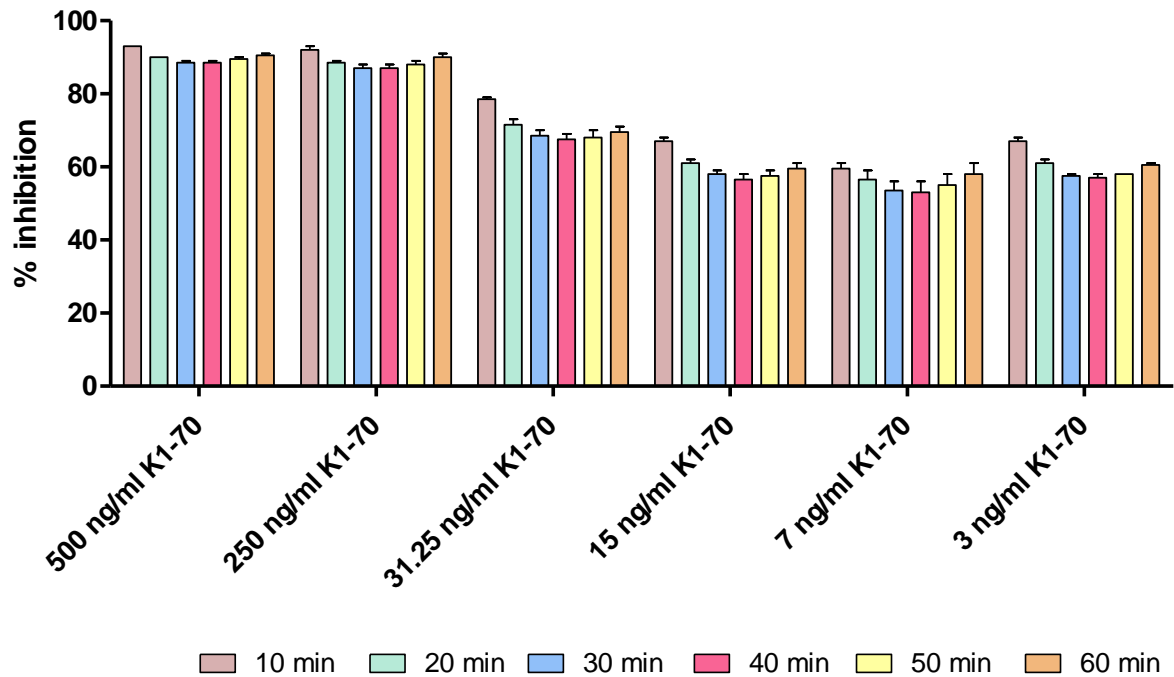


**Abb. 21 % Inhibition der stimulierenden Aktivität von M22 (12 ng/ml) durch 6 K1-70 Konzentrationen (3 - 500 ng/ml).** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 12 ng/ml kombiniert wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Inhibition in %; Basis der Berechnung bildeten die Messwerte der reinen M22-Konzentration von 12 ng/ml.

Entsprechend wurde die Auswertung für die M22-Konzentration von 6 ng/ml vorgenommen (Abb. 22 und 23).



**Abb. 22 RLU-Werte der Kombination von 6 K1-70-Konzentrationen (3 - 500 ng/ml) mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml und Kontrolle.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml kombiniert wurden. Außerdem wurde die nicht blockierte Aktivität der M22-Konzentration von 6 ng/ml als Kontrolle gemessen. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 23 % Inhibition der stimulierenden Aktivität von M22 (6 ng/ml) durch 6 K1-70 Konzentrationen (3 - 500 ng/ml).** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 6 verschiedenen K1-70-Konzentrationen aufgetragen, die mit einer M22-Konzentration von 6 ng/ml kombiniert wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Inhibition in %; Basis der Berechnung bildeten die Messwerte der reinen M22-Konzentration von 6 ng/ml.

#### 4.1.3 Testung von M22 mit verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen

In einem ersten Versuch wurde eine Verdünnungsreihe von M22 (0,195 - 200 ng/ml, vgl. Kapitel 3.2.4.3) in NS nach Inkubationszeiten von 1 h und 2 h im Luminometer gemessen, wobei die CHO Zellen im GS cAMP Reagenz gemeinsam mit den Proben in Triplikaten aufgetragen wurden, bevor die Platten für obig genannte Zeiträume im Inkubator platziert wurden (Versuchsansatz VI).

Abb. 24 und 25 zeigen die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven.

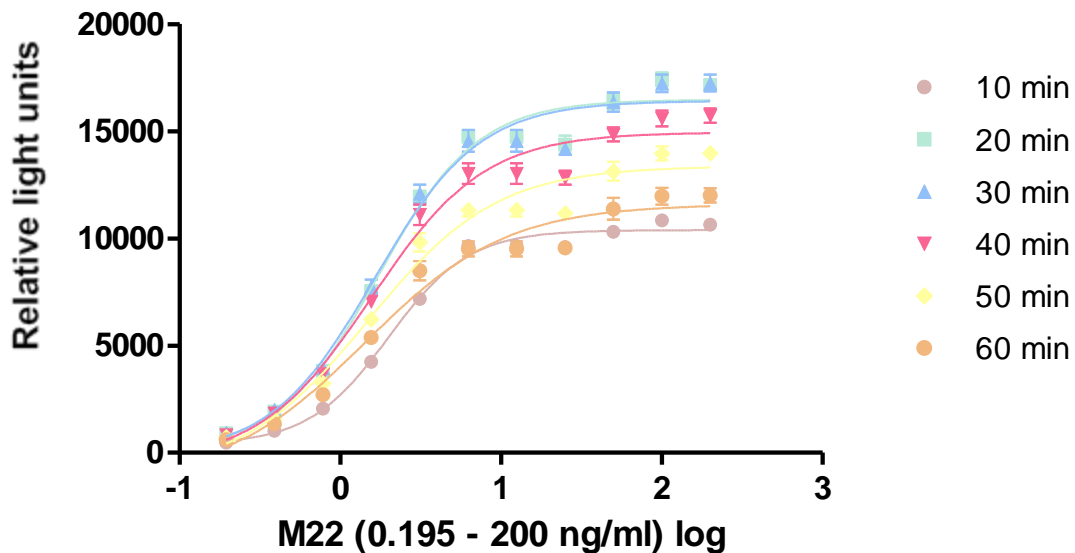


Abb. 24 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 1 h Inkubationszeit, 10 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

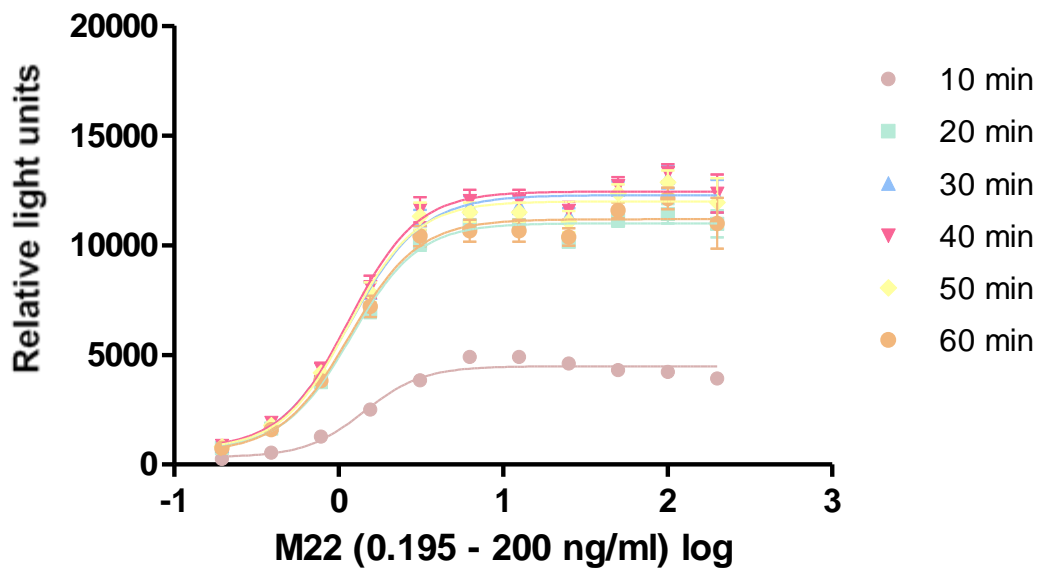
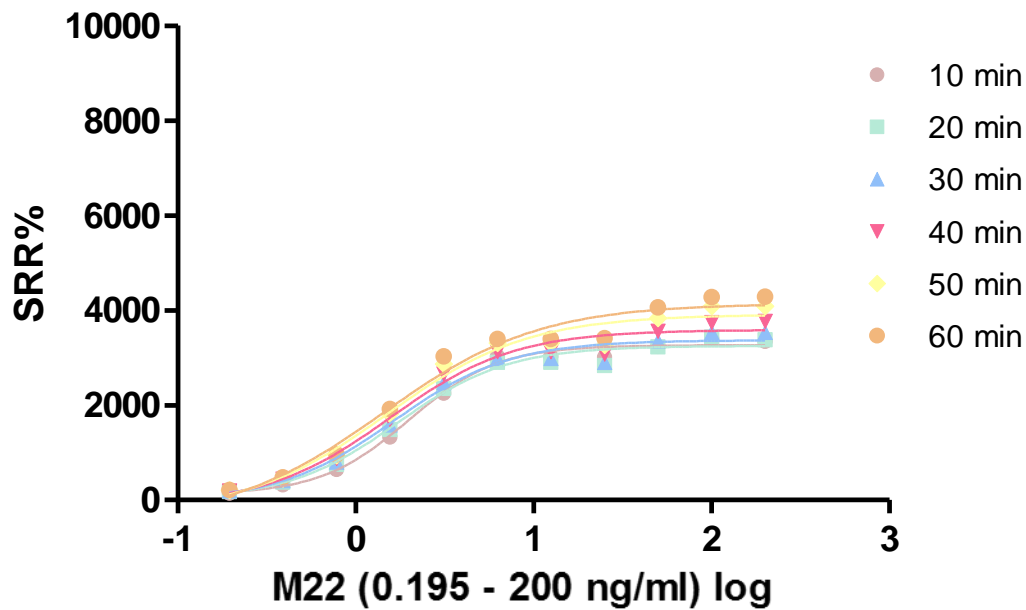
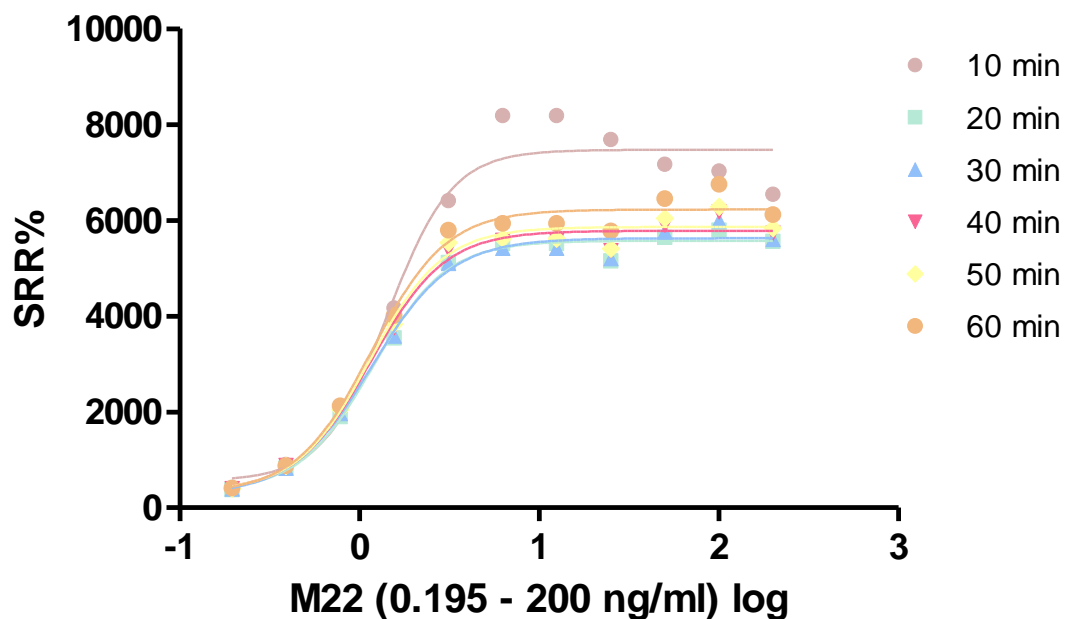


Abb. 25 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 2 h Inkubationszeit, 10 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

Die folgenden Abb. 26 und 27 bilden die SRR% (vgl. Kapitel 3.2.3) in Bezug auf die zu diesem Zeitpunkt neu eingeführte GS Referenzkontrolle in NS ab.



**Abb. 26** Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 1 h Inkubationszeit in SRR%, 10 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden SRR%-Werte in Bezug auf die GS Referenzkontrolle in NS, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 27** Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,195 bis 200 ng/ml in NS nach 2 h Inkubationszeit in SRR%, 10 - 60 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden SRR%-Werte in Bezug auf die GS Referenzkontrolle in NS, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

In einem zweiten Versuch wurde eine weitere Verdünnungsreihe von M22 (0,01 - 50 ng/ml, vgl. Kapitel 3.2.4.3) in NS nach zwei Inkubationsmodellen (60 min 37 °C, CO<sub>2</sub> + 30 min RT vs. 60 min RT) im Luminometer gemessen (Versuchsansatz VII).

Abb. 28 zeigt die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven, wo sich die Auswertung aufgrund der Datenfülle auf die Messzeitpunkte von 30 und 40 min beschränkt.

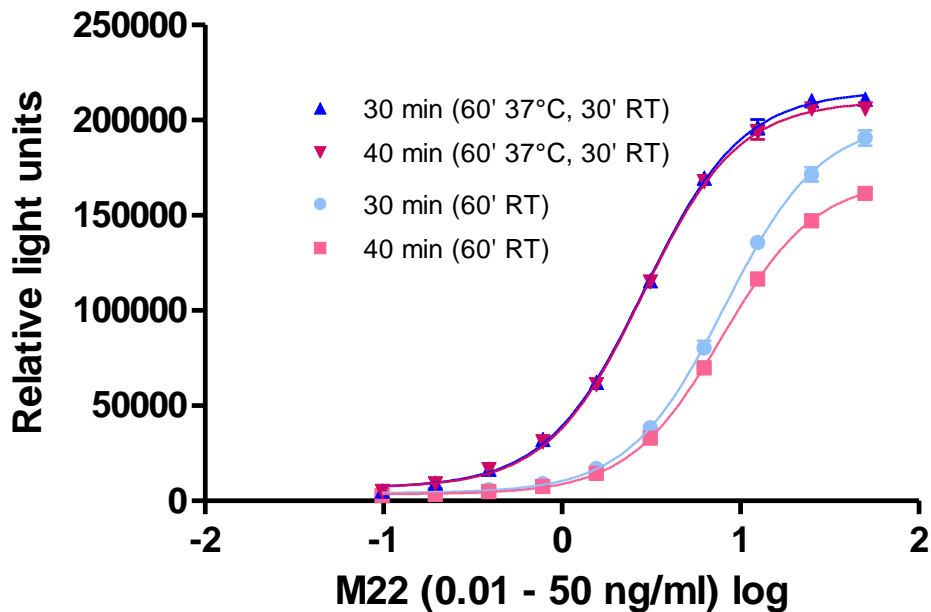


Abb. 28 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,01 bis 50 ng/ml in NS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen, 30 und 40 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

Abb. 29 stellt die SRR%-Werte in Bezug auf die GS Referenzkontrolle in NS dar:

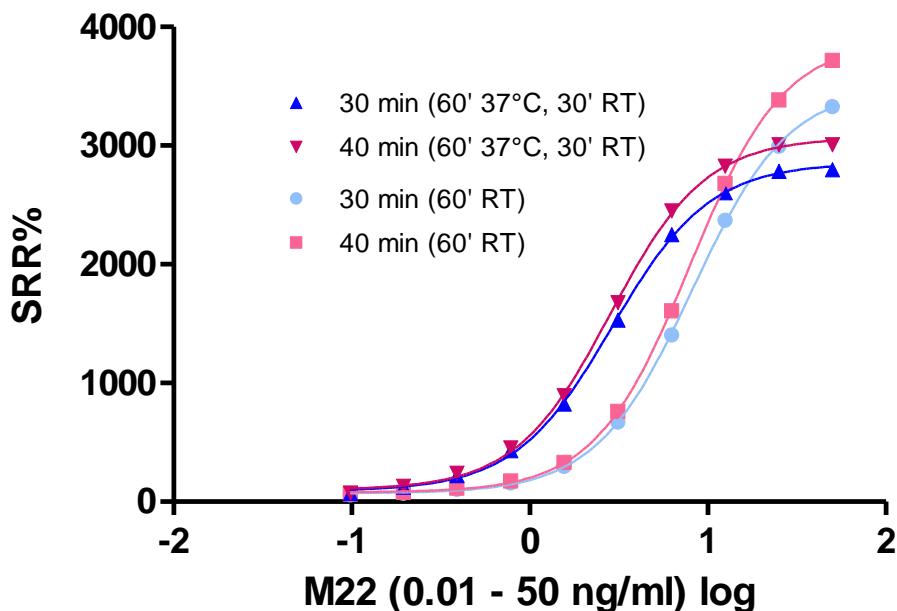
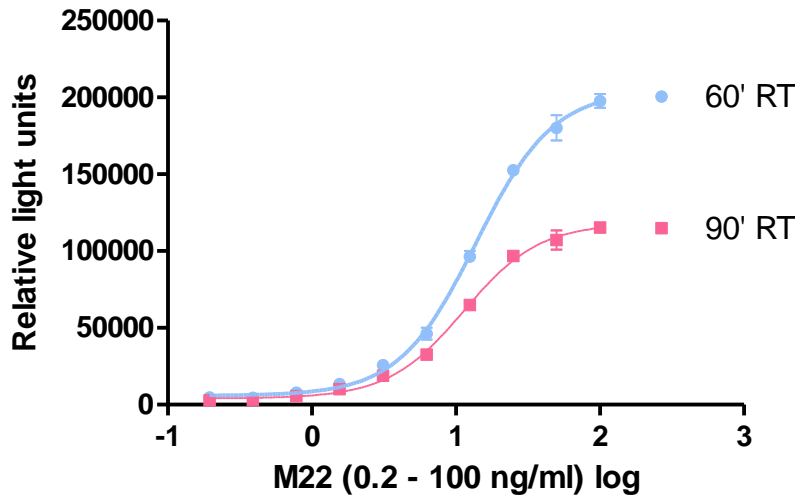
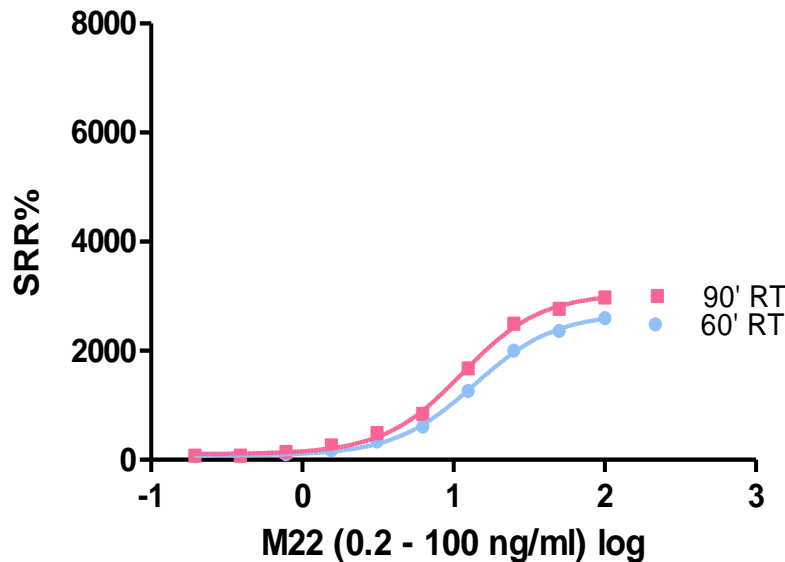


Abb. 29 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,01 bis 50 ng/ml in NS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen in SRR%, 30 und 40 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden SRR%-Werte in Bezug auf die GS Referenzkontrolle in NS, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

In einem Wiederholungsversuch unter den gleichen Bedingungen mit einem M22-Verdünnungsspektrum von 0,2 - 100 ng/ml konnte zum einen ein Vergleich zwischen 60 und 90 min Inkubation ausschließlich bei RT (Abb. 30 und 31) und zum anderen der Dauer der Inkubation bei RT nach 60 min im Inkubator (Abb. 32 und 33) gezogen werden.



**Abb. 30 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 und 90 min RT.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 31 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 und 90 min RT in SRR%.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden SRR%-Werte in Bezug auf die GS Referenzkontrolle in NS, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

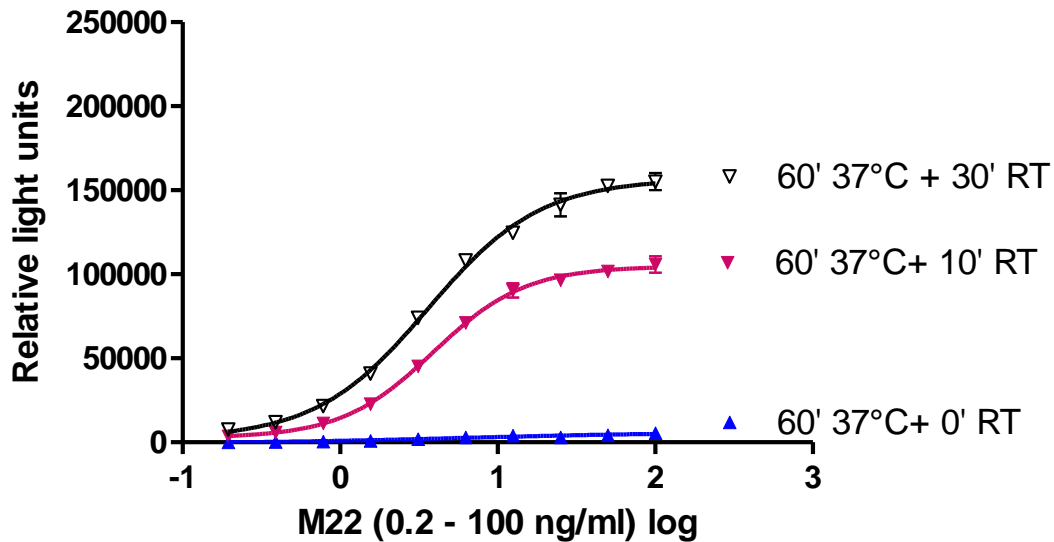


Abb. 32 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) und 0, 10, 30 min RT. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

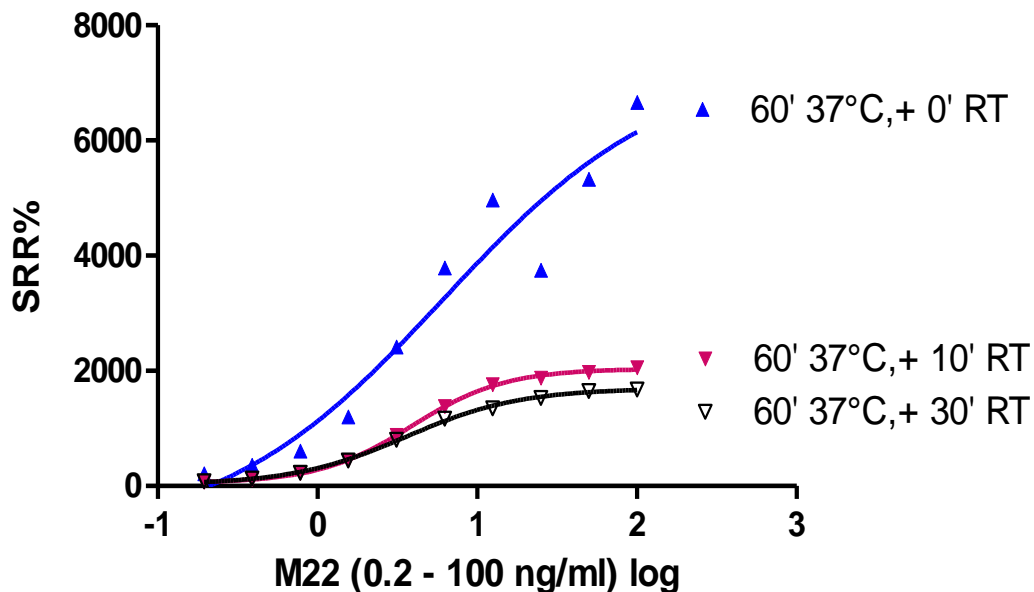


Abb. 33 Dosis-Wirkungskurve der Stimulation mit M22 in den Konzentrationen 0,2 bis 100 ng/ml in NS nach Inkubation bei 60 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) und 0, 10, 30 min RT in SRR%. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die M22-Konzentrationen; die y-Achse die korrespondierenden SRR%-Werte in Bezug auf die GS Referenzkontrolle in NS, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

## 4.2 Stimulation mit Patientenseren und euthyreoten Kontrollen

### 4.2.1 Verdünnung einer hochpositiven TSI-Serumprobe

Die Verdünnung einer hochpositiven TSI-Probe (714 SSR% im Thyretain® TSI Bioassay) in verdünntem NS bis zu einer Verdünnung von 1:2816, wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben, ergab folgende Dosis-Wirkungskurven, die nach Messzeit in 10 bis 30 min (Abb. 34) und 40 bis 60 min (Abb. 35) unterteilt sind.

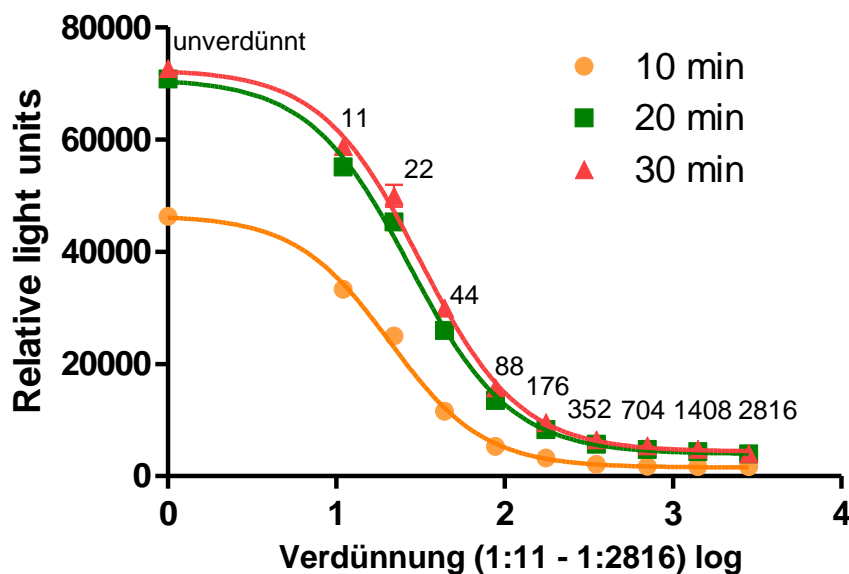
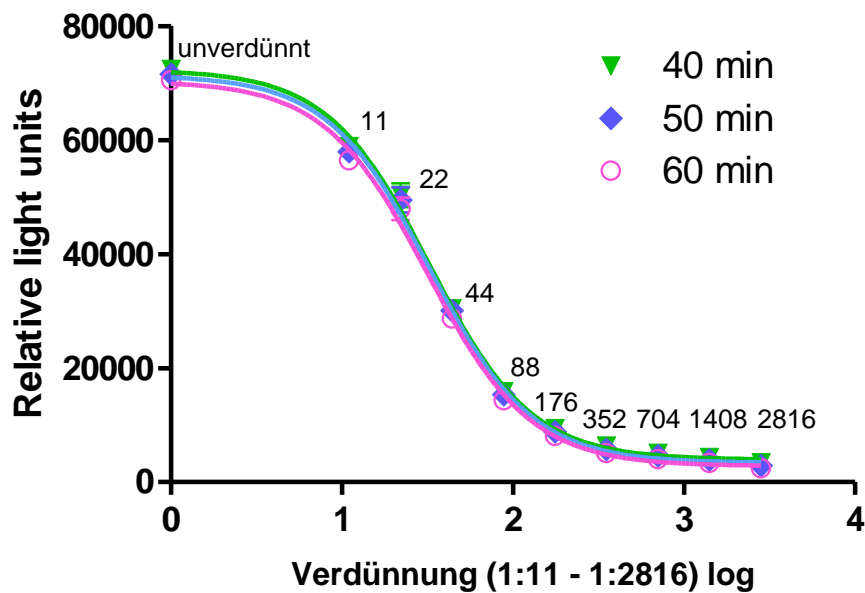


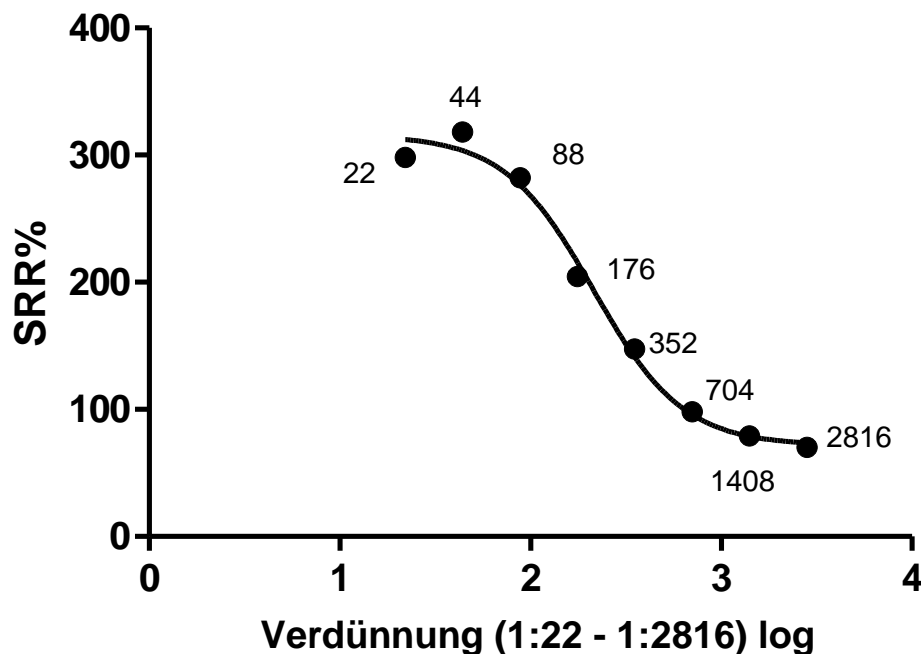
Abb. 34 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Probe in den Verdünnungen 1:11 bis 1:2816 in verdünntem NS, 10 - 30 min. Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die Verdünnungen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist. Der eingetragene Punkt ist zusätzlich um die Angabe der Verdünnung 1:x ergänzt.





**Abb. 35 Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Probe in den Verdünnungen 1:11 bis 1:2816 in verdünntem NS, 40 - 60 min.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die Verdünnungen; die y-Achse die korrespondierenden RLU-Werte, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist. Der eingetragene Punkt ist zusätzlich um die Angabe der Verdünnung 1:x ergänzt.

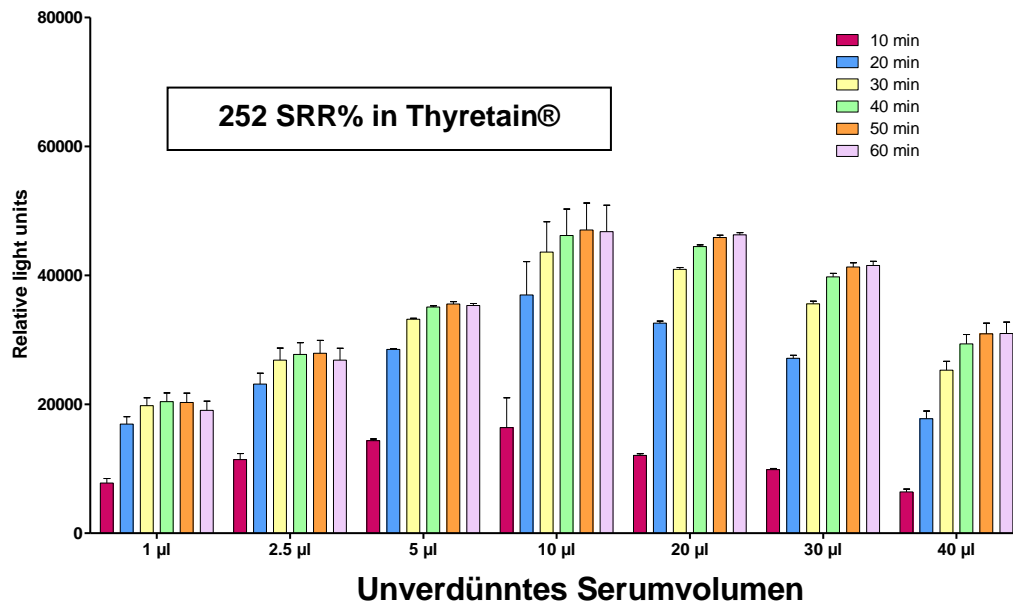
Die folgende Darstellung der Dosis-Wirkungskurve der gleichen verdünnten Probe im Thyretain® TSI Bioassay in SRR% erlaubt einen Vergleich der beiden Assays.



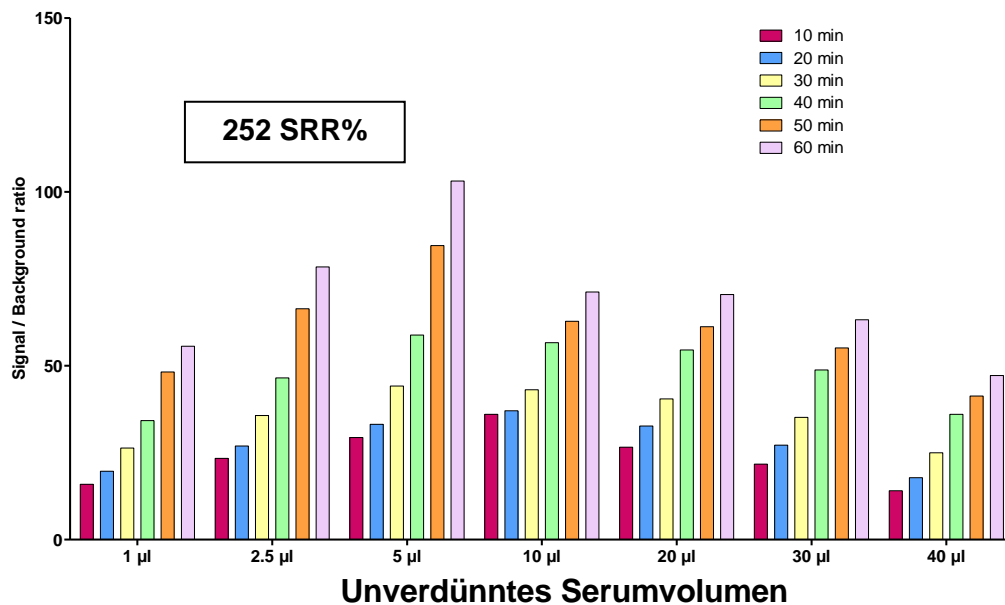
**Abb. 36 Thyretain® TSI Bioassay: Dosis-Wirkungskurve nach Stimulation mit Verdünnungen einer hochpositiven TSI-Probe in den Verdünnungen 1:22 bis 1:2816 in verdünntem NS in SRR%.** Die x-Achse zeigt in logarithmischem Auftrag die Verdünnungen; die y-Achse die korrespondierenden SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle des Kits, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist. Der eingetragene Punkt ist zusätzlich um die Angabe der Verdünnung 1:x ergänzt. Die Verdünnung 1:11 fehlt an dieser Stelle, da aufgrund des Assay-Protokolls der finale Wert von 714 SRR% bereits einer Verdünnung von 1:11 entspricht.

## 4.2.2 Testung verschiedener Volumina niedrig-, moderat und hochpositiver TSI-Serumproben

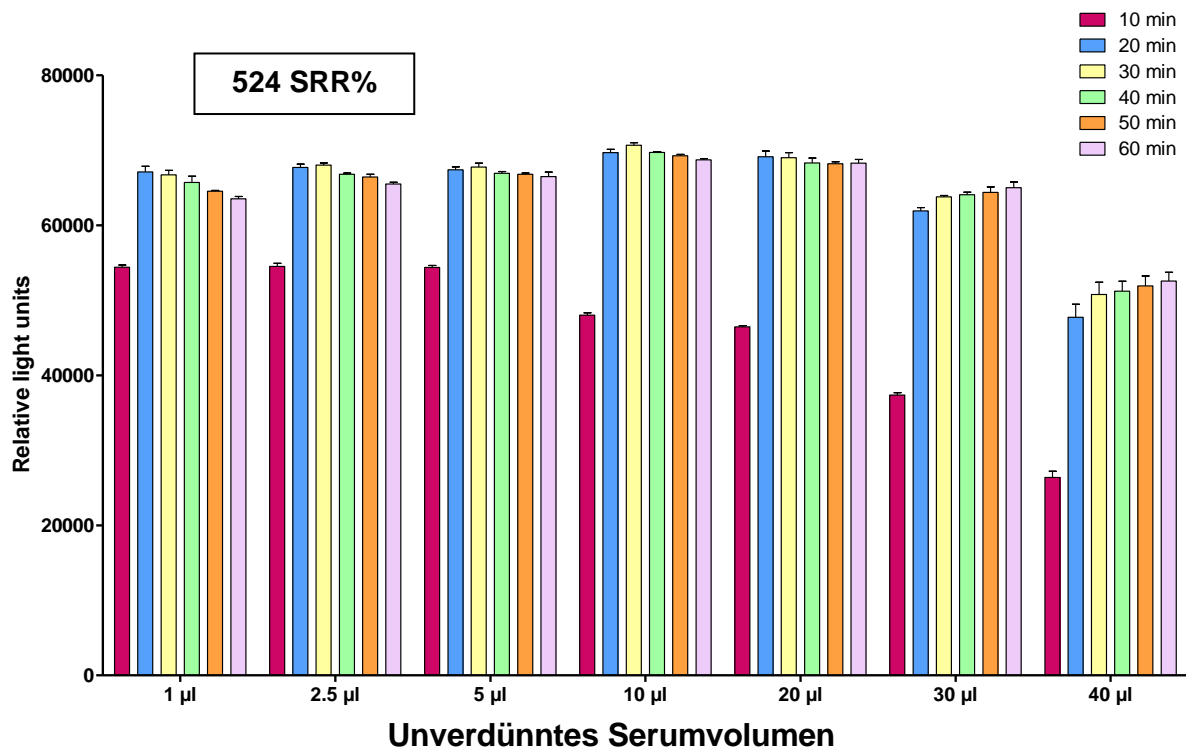
In einem ersten Versuch (vgl. Kapitel 3.2.5.3) wurden je eine moderat (Abb. 37 und 38) und hochpositive (Abb. 39 und 40) TSI-Probe in verschiedenen Volumina in Triplikaten gemessen. Neben den RLU-Daten wurde erneut je das S/B Ratio berechnet und in einem Säulendiagramm aufgetragen.



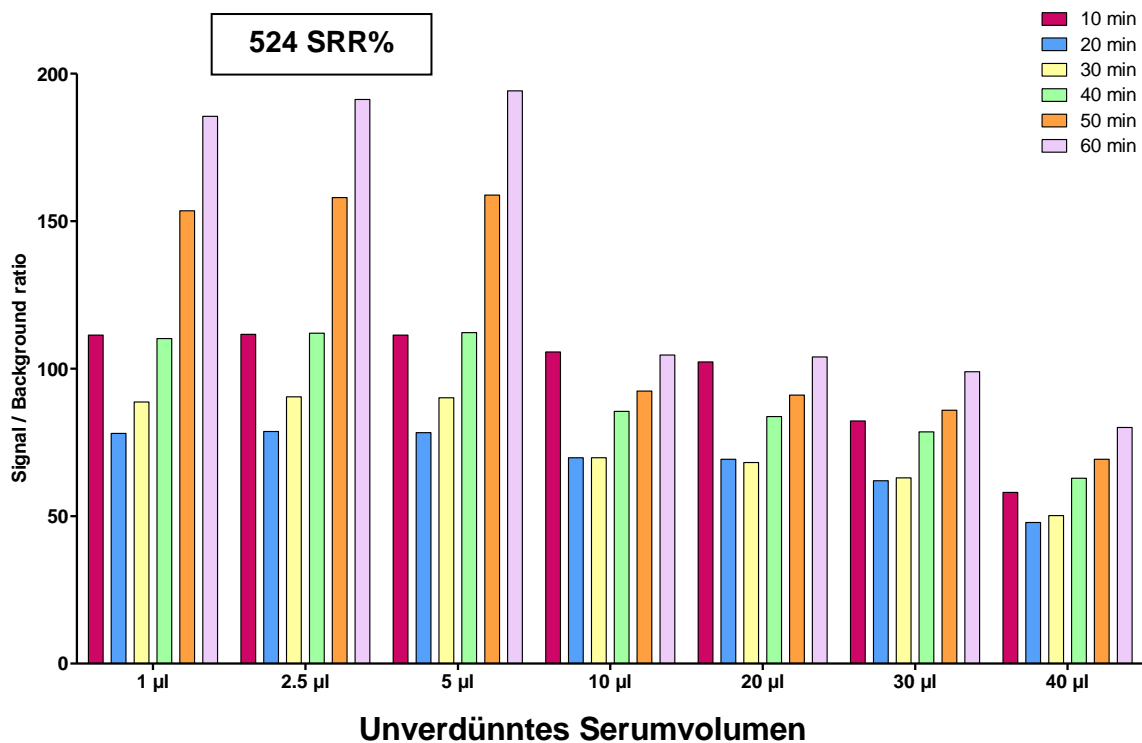
**Abb. 37 RLU-Werte einer moderat positiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 7 verschiedenen Volumina aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 38 S/B Ratio nach Stimulation mit einer moderat positiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 7 verschiedenen Volumina aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt das S/B Ratio. Die Rechnung erfolgte mit einem Hintergrund von 100 µl des Equilibrierungsmediums (6 % GS cAMP Reagenz verdünnt in RB) mit 10 µl RB.

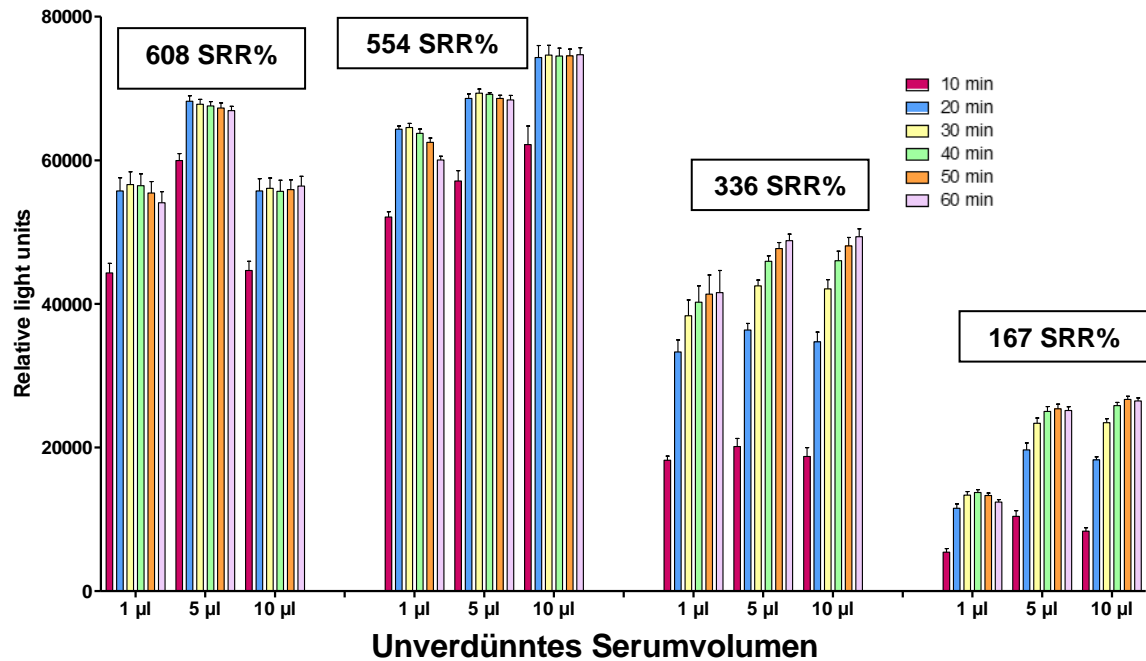


**Abb. 39 RLU-Werte einer hochpositiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 7 verschiedenen Volumina aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

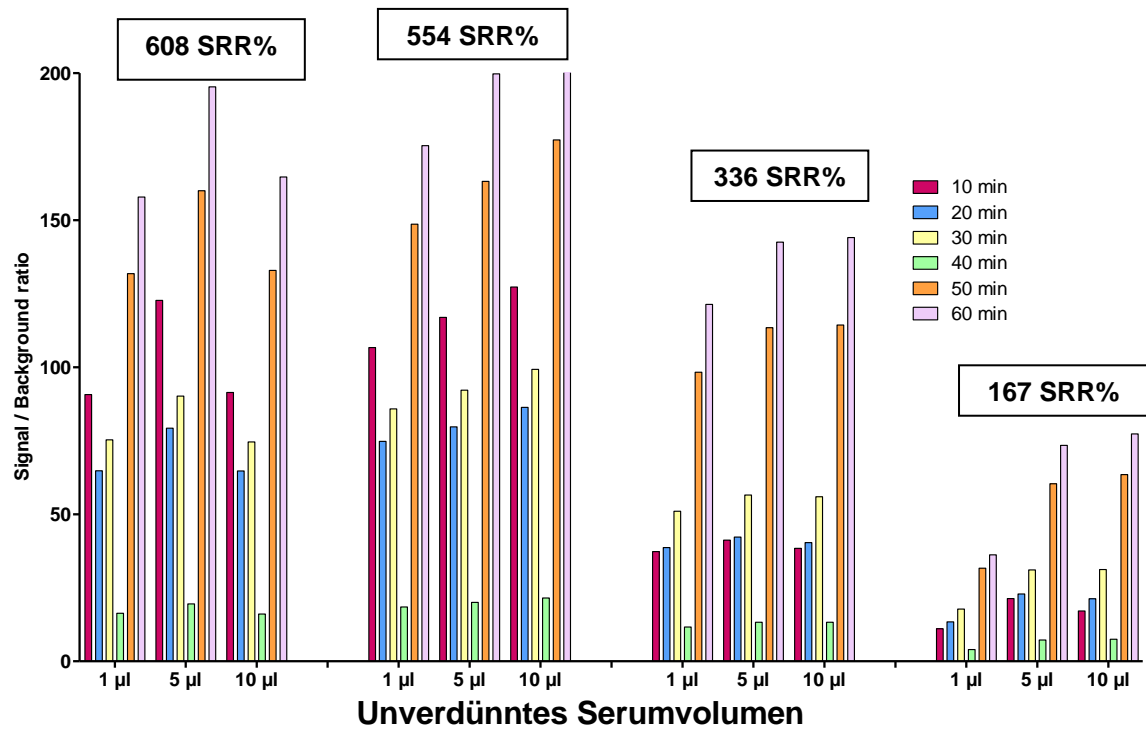


**Abb. 40 S/B Ratio nach Stimulation mit einer hochpositiven TSI-Probe in Volumina von 1 - 40 µl.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die 7 verschiedenen Volumina aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt das S/B Ratio. Die Rechnung erfolgte mit einem Hintergrund von 100 µl des Equilibrierungsmediums (6 % GS cAMP Reagenz verdünnt in RB) mit 10 µl RB.

In einem zweiten Versuch wurden je eine niedrig, moderat und zwei hochpositive TSI-Proben in verschiedenen Volumina in Triplikaten gemessen. Neben den RLU-Daten wurde erneut je das S/B Ratio berechnet und in einem Säulendiagramm aufgetragen.



**Abb. 41 RLU-Werte von 4 TSI-Proben im Vergleich in Volumina von 1 - 10 µl.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse für jede Probe die 3 verschiedenen Volumina aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

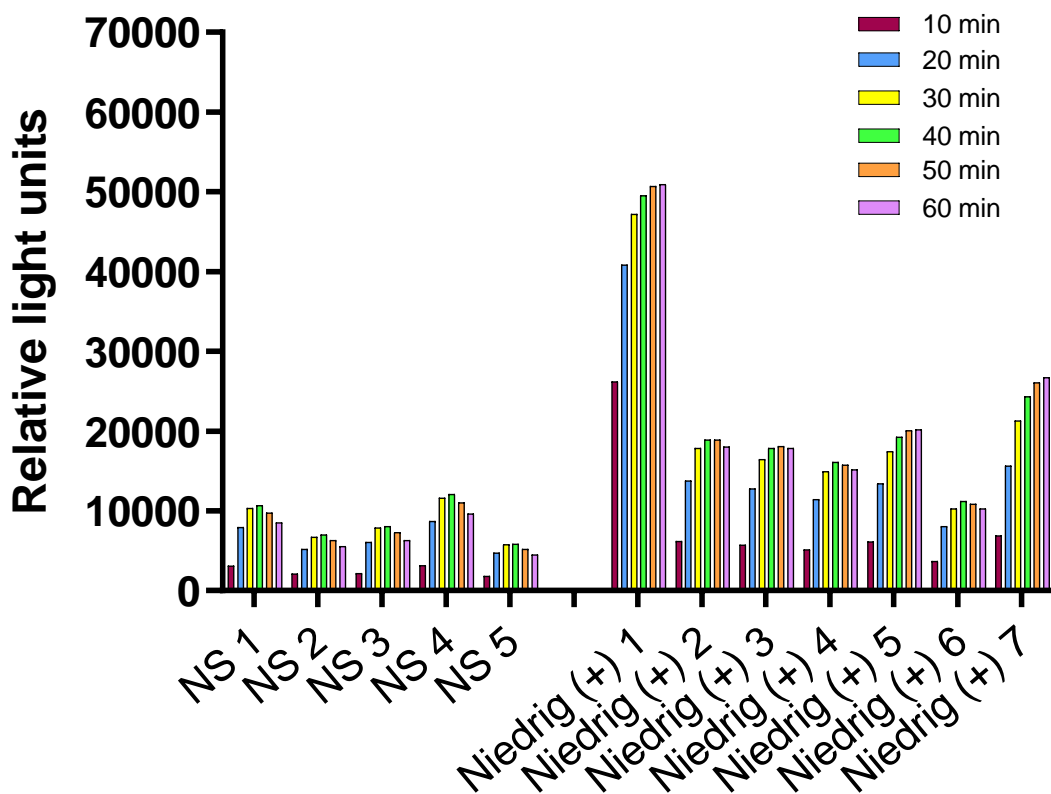


**Abb. 42 S/B Ratio nach Stimulation mit 4 verschiedenen TSI-Proben im Vergleich in Volumina von 1 - 10 µl.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse für jede Probe die 3 verschiedenen Volumina aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt das S/B Ratio. Die Rechnung erfolgte mit einem Hintergrund von 100 µl des Equilibrierungsmediums (6 % GS cAMP Reagenz verdünnt in RB) mit 10 µl RB.

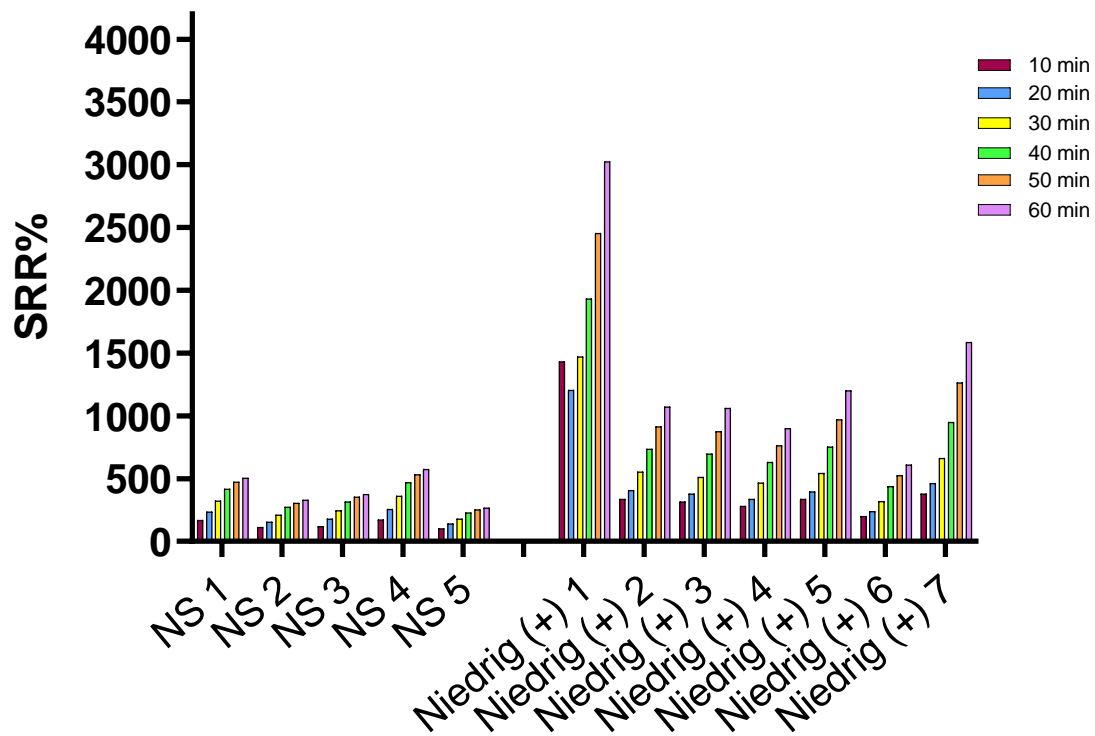
### 4.2.3 Testung klinischer Proben in Duplikaten

Die Testung klinischer Proben sollte nun intensiviert werden, um die Funktionalität des Assays im Hinblick auf NS, niedrig, moderat und hochpositive Proben zu evaluieren. Wie in Kapitel 3.2.5.4 aufgezeigt, wurden in der Summe 25 Proben in Duplikaten getestet. Die RLU-Daten werden gemeinsam mit den SRR% bezogen auf die mitgemessene Referenzkontrolle präsentiert.

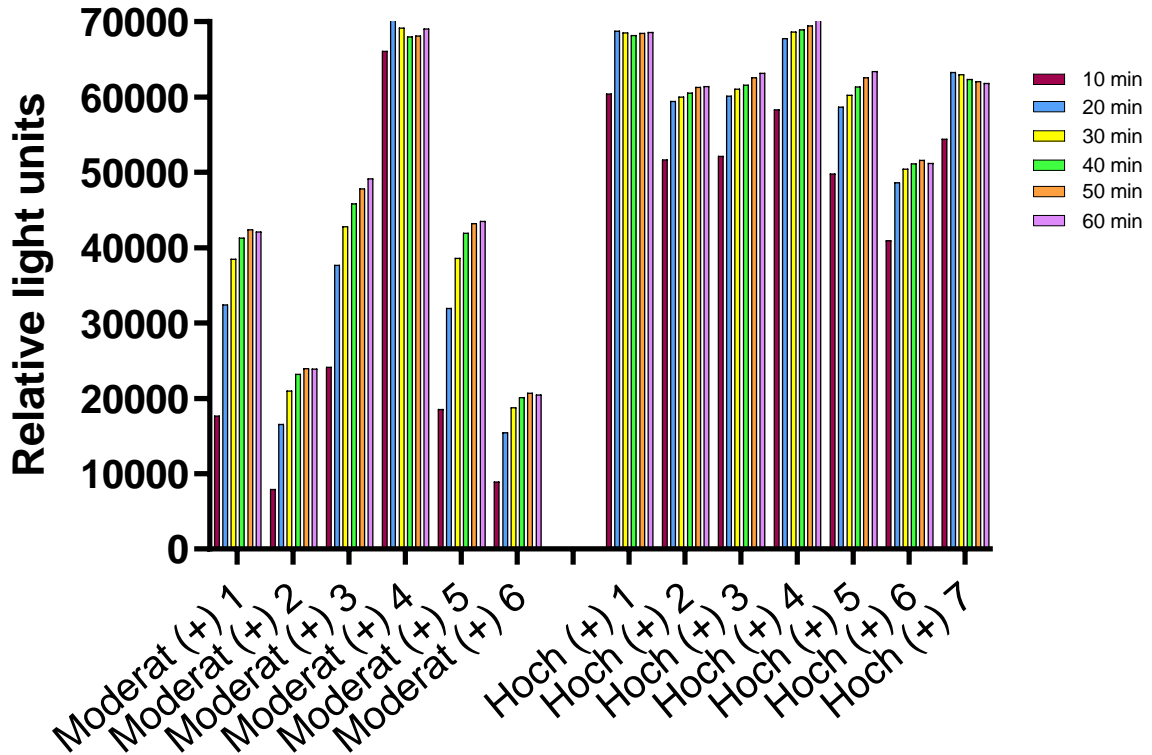
Abb. 43 und 44 zeigen NS und niedrig positive TSI-Proben, Abb. 45 und 46 dagegen moderat und hochpositive TSI-Proben.



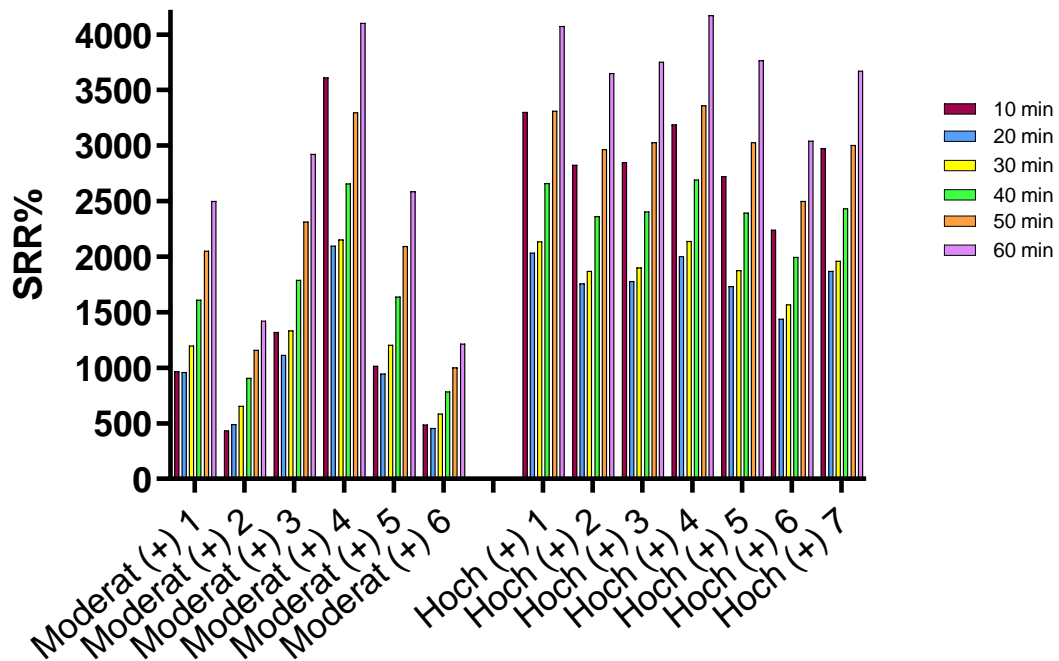
**Abb. 43 RLU-Werte von 5 NS und 7 niedrig positiven TSI-Proben.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



**Abb. 44 SRR%-Werte von 5 NS und 7 niedrig positiven TSI-Proben.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



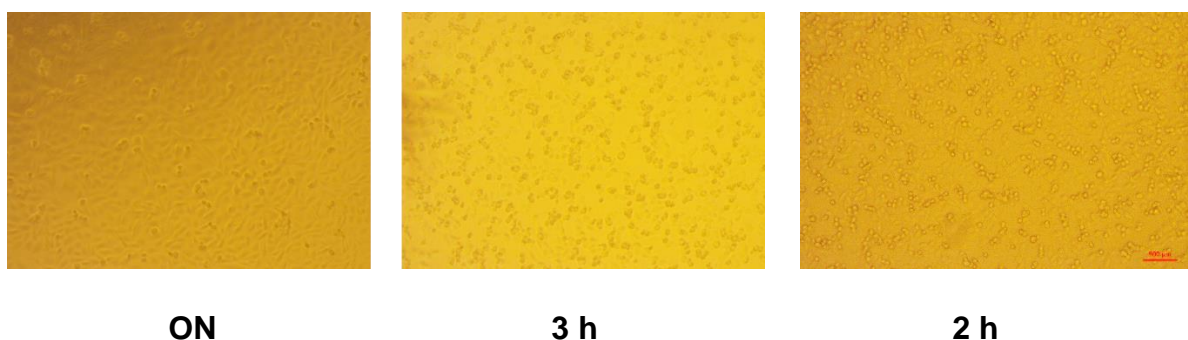
**Abb. 45 RLU-Werte von 6 moderat und 7 hochpositiven TSI-Proben.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



**Abb. 46 SRR%-Werte von 6 moderat und 7 hochpositiven TSI-Proben.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

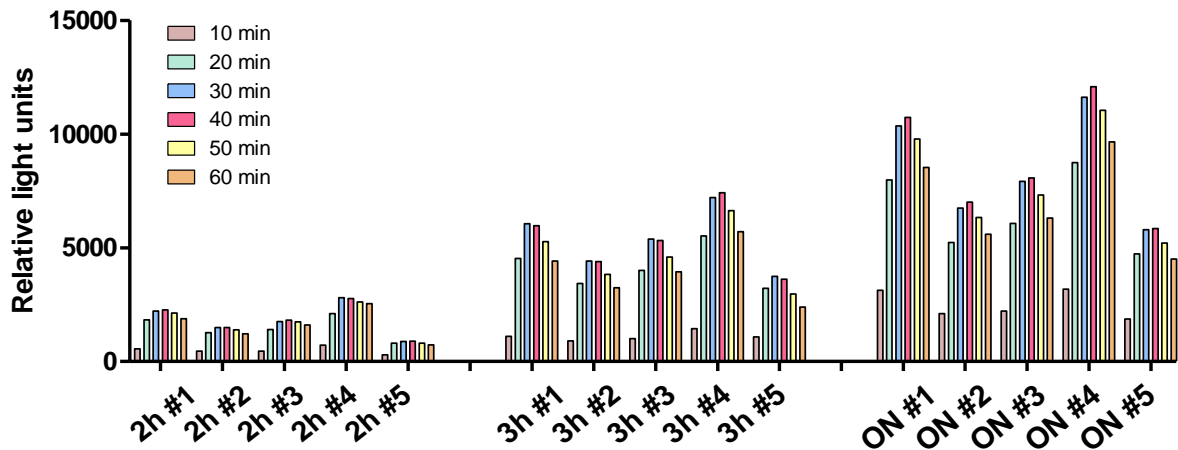
#### 4.2.4 Testung klinischer Proben zum Vergleich von 3 Zellwachstumszeiten: ON, 3 h, 2 h

Die Proben aus Kapitel 4.2.3 sind identisch mit den an dieser Stelle ausgewerteten. Es werden verschiedene Zellwachstumszeiten miteinander verglichen, wobei das Wachstum ON den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.3 entspricht. Um die Konfluenz der Zellen zu vergleichen, wurden mikroskopische Fotografien der Zellschichten angefertigt:

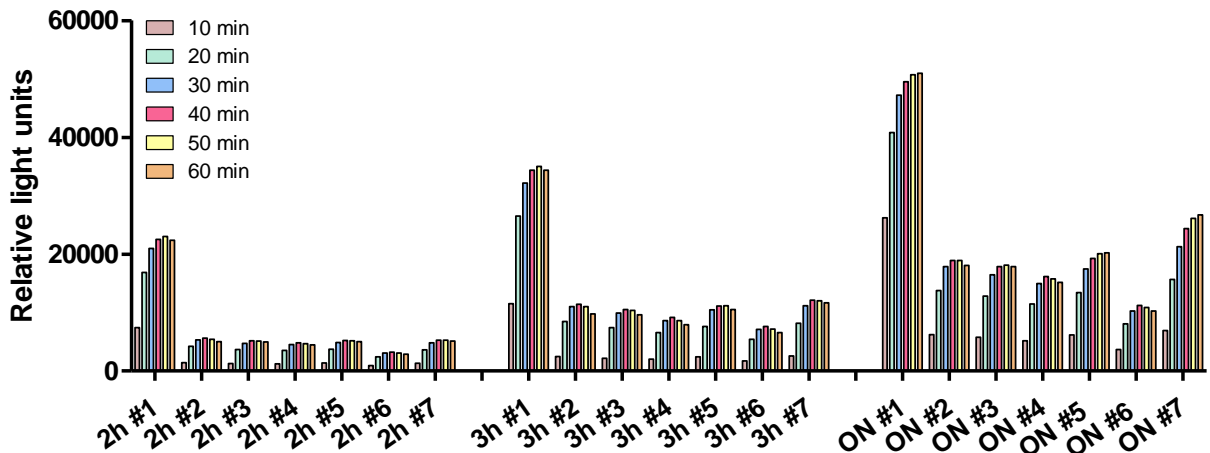


**Abb. 47 Zellmorphologien der CHO Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit.** Die Fotografien wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Legende am rechten unteren Bildrand zeigt die Größenordnung von 500  $\mu\text{m}$  und kann auf alle drei Fotografien angewendet werden.

Für jede Serumprobengruppe werden die verschiedenen Wachstumszeiten im Folgenden nebeneinander in RLU präsentiert.

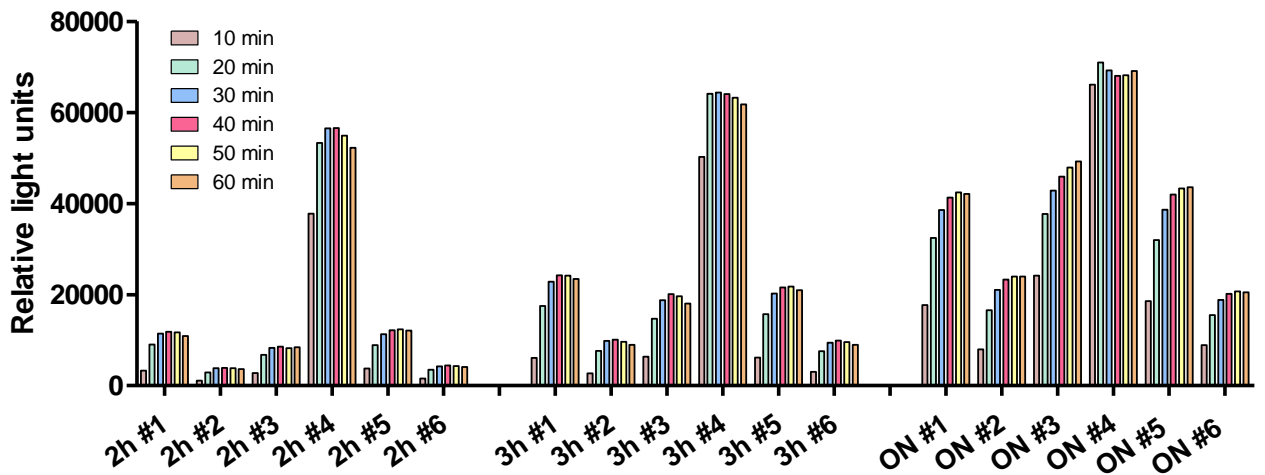


**Abb. 48 RLU-Werte von 5 NS im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden, geordnet nach Zellwachstumszeit. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

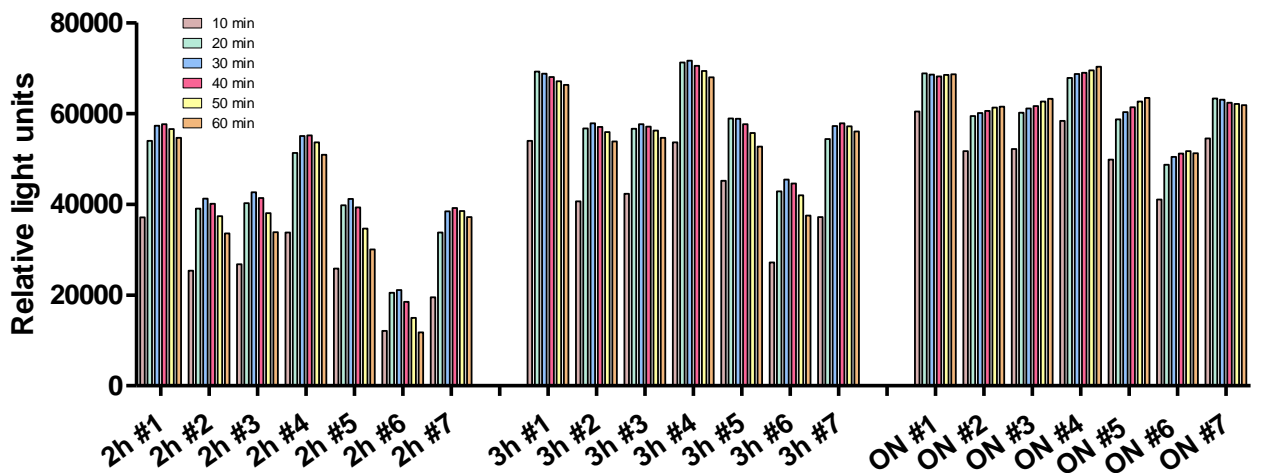


**Abb. 49 RLU-Werte von 7 niedrig TSI-positiven Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden, geordnet nach Zellwachstumszeit. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



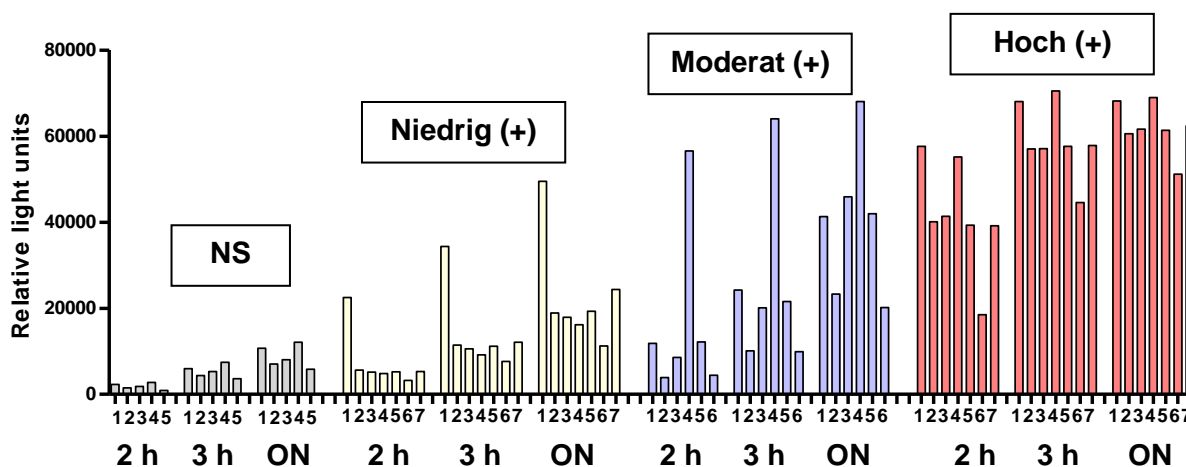


**Abb. 50 RLU-Werte von 6 moderat TSI-positiven Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden, geordnet nach Zellwachstumszeit. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



**Abb. 51 RLU-Werte von 7 hoch TSI-positiven Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden, geordnet nach Zellwachstumszeit. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

Aufgrund der Datenfülle beschränkt sich das zusammenfassende Säulendiagramm auf einen Messzeitpunkt von 40 min:



**Abb. 52 RLU-Werte aller getesteten Proben im Vergleich: 2h, 3h, ON Zellwachstumszeit, 40 min.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden, geordnet nach Zellwachstumszeit. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

#### 4.2.5 Testung klinischer Proben in 18 Replikaten

Um die Reproduzierbarkeit eines Messergebnisses zu testen, wurden ein NS, eine niedrig und eine moderat positive Probe in 18 Replikaten nach einer Zellwachstumszeit von 2 h (vgl. Kapitel 3.2.5.6) gemessen. Die Ergebnisse sind aufgrund der hohen Anzahl an Replikaten tabellarisch dargestellt.

**Tab. 23 RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 10 min Messzeit**

	Relative light units (RLU)									Mittelwert	Standardabweichung	CV%
<b>NS</b> 80 SRR%	377	367	355	334	412	395	369	467	502	404	63	15.6%
	375	385	352	348	562	354	404	494	421			
<b>Niedrig TSAb (+)</b> 155 SRR%	1294	1158	1207	1024	990	1025	1079	1262	1326	1174	141	12.0%
	1343	1169	1246	1158	1045	1035	987	1335	1444			
<b>Moderat TSAb (+)</b> 283 SRR%	3870	3979	3602	3510	3508	3307	3124	3021	3441	3522	286	8.1%
	3925	3830	3703	3686	3604	3565	3355	3122	3237			

4 Ergebnisse

**Tab. 24 RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 20 min Messzeit**

	Relative light units (RLU)									Mittelwert	Standardabweichung	CV%
<b>NS</b> 80 SRR%	787	768	773	765	883	902	746	923	902	853	103	12.1%
	835	858	775	828	1194	794	824	899	897			
<b>Niedrig TSAb (+)</b> 155 SRR%	2822	2696	2642	2346	2374	2309	2179	2670	2517	2533	233	9.2%
	3031	2708	2708	2405	2396	2358	2154	2702	2571			
<b>Moderat TSAb (+)</b> 283 SRR%	7633	7822	7304	7120	7000	6904	6374	5928	6352	6825	571	8.4%
	7200	7275	7059	7087	6855	6737	6356	5923	5927			

**Tab. 25 RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 30 min Messzeit**

	Relative light units (RLU)									Mittelwert	Standardabweichung	CV%
<b>NS</b> 80 SRR%	856	863	803	883	1018	945	710	1002	1014	947	151	15.9%
	973	948	901	916	1464	881	895	980	992			
<b>Niedrig TSAb (+)</b> 155 SRR%	3426	3276	3245	2913	2809	2870	2774	3111	2831	3031	268	8.8%
	3484	3244	3368	3094	2847	2784	2592	3160	2737			
<b>Moderat TSAb (+)</b> 283 SRR%	9108	9295	8915	8525	8483	8216	7551	7293	7065	7934	820	10.3%
	8163	8345	8118	8133	7851	7691	7012	6512	6534			

**Tab. 26 RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 40 min Messzeit**

	Relative light units (RLU)									Mittelwert	Standardabweichung	CV%
<b>NS</b> 80 SRR%	783	790	743	737	960	887	658	856	966	865	154	17.8%
	956	833	778	822	1368	817	749	910	948			
<b>Niedrig TSAb (+)</b> 155 SRR%	3202	3293	3120	2814	2821	2767	2704	2843	2655	2910	271	9.3%
	3475	3143	3183	2990	2769	2730	2508	2840	2518			
<b>Moderat TSAb (+)</b> 283 SRR%	8817	9015	8504	8318	7965	7991	7237	6678	6301	7481	939	12.6%
	7955	7819	7619	7580	7390	7189	6467	6082	5727			

**Tab. 27 RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 50 min Messzeit**

	Relative light units (RLU)									Mittelwert	Standardabweichung	CV%
<b>NS</b> 80 SRR%	630	626	632	631	738	777	520	668	810	718	131	18.2%
	749	727	717	724	1166	689	653	731	737			
<b>Niedrig TSAb (+)</b> 155 SRR%	2954	2791	2800	2505	2527	2378	2297	2416	2219	2561	288	11.2%
	3157	2822	2868	2709	2415	2518	2196	2375	2153			
<b>Moderat TSAb (+)</b> 283 SRR%	7714	7622	7520	7067	6911	6919	6351	5624	5072	6376	914	14.3%
	6730	6632	6639	6414	6244	6117	5601	5157	4426			

**Tab. 28 RLU-Angaben mit Mittelwert, Standardabweichung und CV% der 3 getesteten Seren in 18 Replikaten nach 60 min Messzeit**

	Relative light units (RLU)									Mittelwert	Standardabweichung	CV%
<b>NS</b> 80 SRR%	492	515	483	523	630	587	414	555	615	567	105	18.5%
	588	575	538	567	925	551	477	576	590			
<b>Niedrig TSAb (+)</b> 155 SRR%	2502	2396	2458	2171	2129	2118	1852	1890	1869	2153	256	11.9%
	2541	2403	2444	2277	2113	2029	1884	1888	1797			
<b>Moderat TSAb (+)</b> 283 SRR%	6179	6144	6251	5687	5659	5735	5115	4533	3741	5148	810	15.7%
	5376	5377	5291	5347	5263	4923	4507	4081	3461			

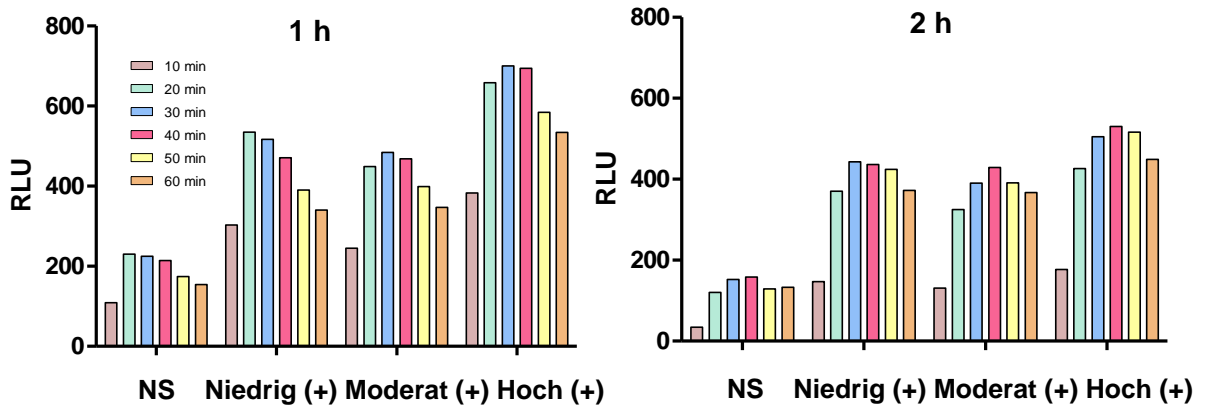
#### 4.2.6 Testung klinischer Proben zum Vergleich von Inkubationszeiten und -bedingungen: Inkubator vs. RT

Zu genaueren Angaben zur Versuchsdurchführung s. Kapitel 3.2.5.7.

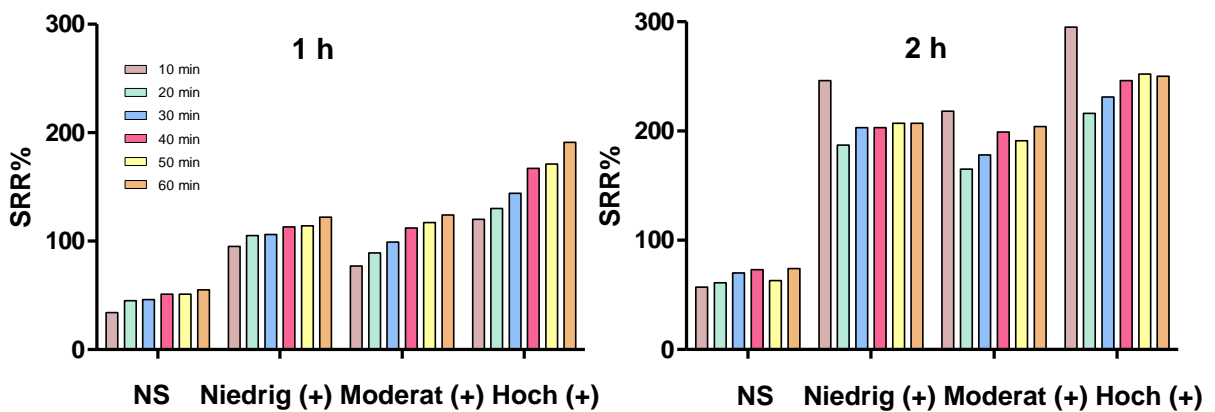
##### 1. Versuch: Inkubation über 1 h vs. 2 h im Inkubator, 4 Proben

Im ersten Versuch wurden je ein NS sowie je eine niedrig, moderat und hochpositive Probe in Triplikaten gemessen, nachdem die Inkubationszeit 1 h bzw. 2 h betragen hatte. Die Ergebnisse sind in RLU (Abb. 53 und 54) und SRR% (Abb. 55 und 56) dargestellt.

## 4 Ergebnisse



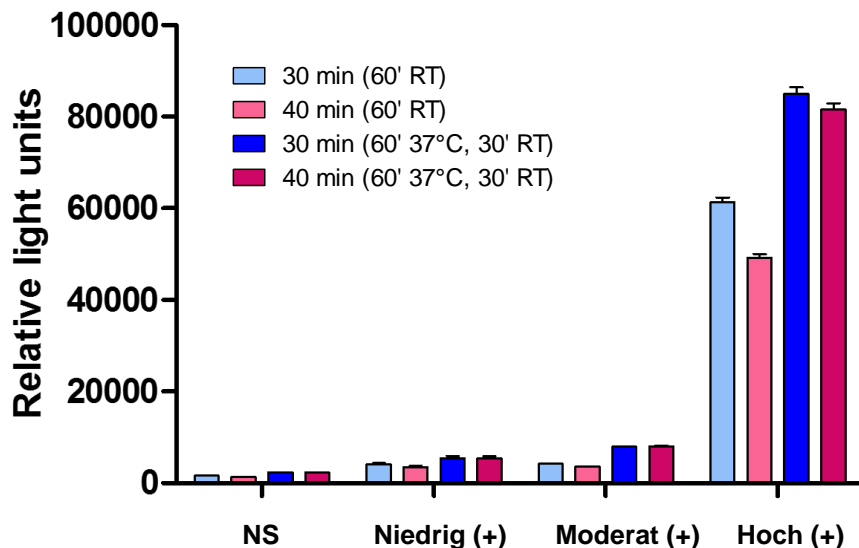
**Abb. 53 + 54 RLU-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 1 h vs. 2 h Inkubationszeit im Inkubator.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Gruppierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



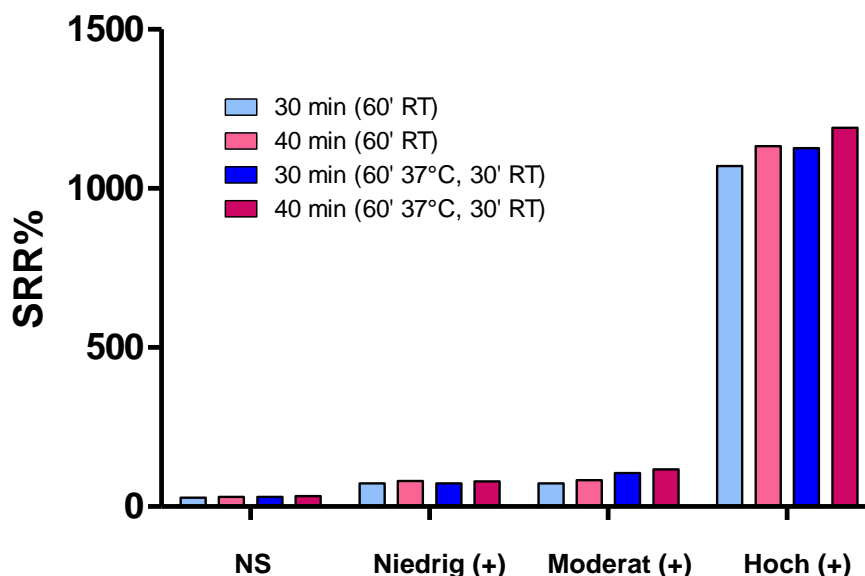
**Abb. 55 + 56 SRR%-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 1 h vs. 2 h Inkubationszeit im Inkubator.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Gruppierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 6 Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

2. Versuch: Inkubation über 60 min RT vs. 60 min im Inkubator + 30 min RT, 4 Proben

Im Versuch wurden je ein NS sowie je eine niedrig, moderat und hochpositive Probe in Triplikaten gemessen, wobei die obig genannten Inkubationsbedingungen miteinander verglichen wurden. Dabei beschränkt sich die Datendarstellung aufgrund der Datenmenge auf Messzeiten von 30 und 40 min. Gezeigt sind die Rohdaten in RLU und zudem die SRR%-Werte.



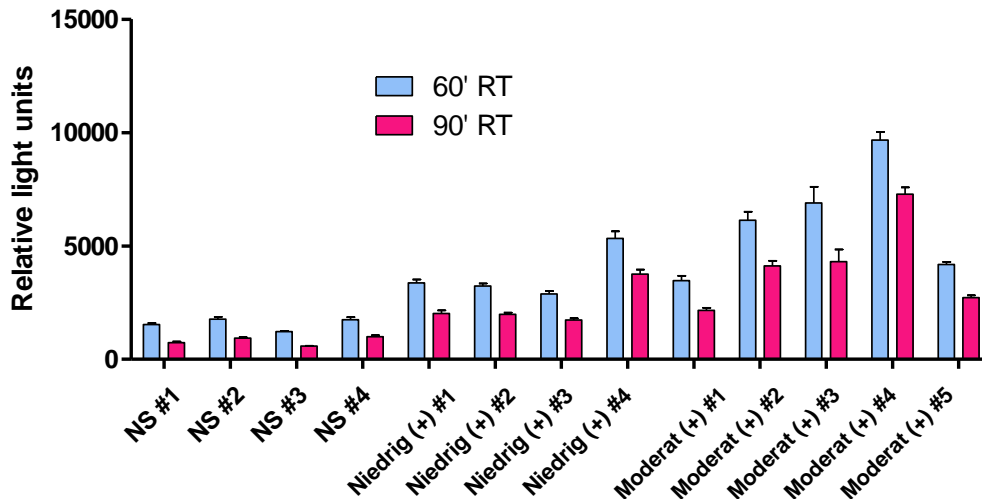
**Abb. 57 RLU-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 60 min im Inkubator + 30 min bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Gruppierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 2 Zeitpunkten (30, 40 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



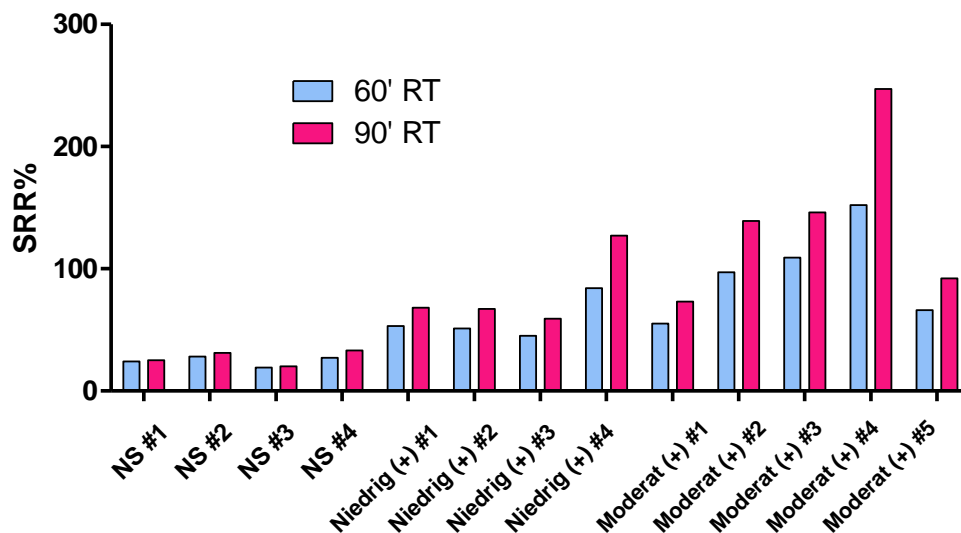
**Abb. 58 SRR%-Werte aller 4 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 60 min im Inkubator + 30 min bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Gruppierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde zu 2 Zeitpunkten (30, 40 min) gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

3. Versuch: Inkubation über 60/90 min RT vs. 60 min im Inkubator + 0/10/30 min RT, 13 Proben

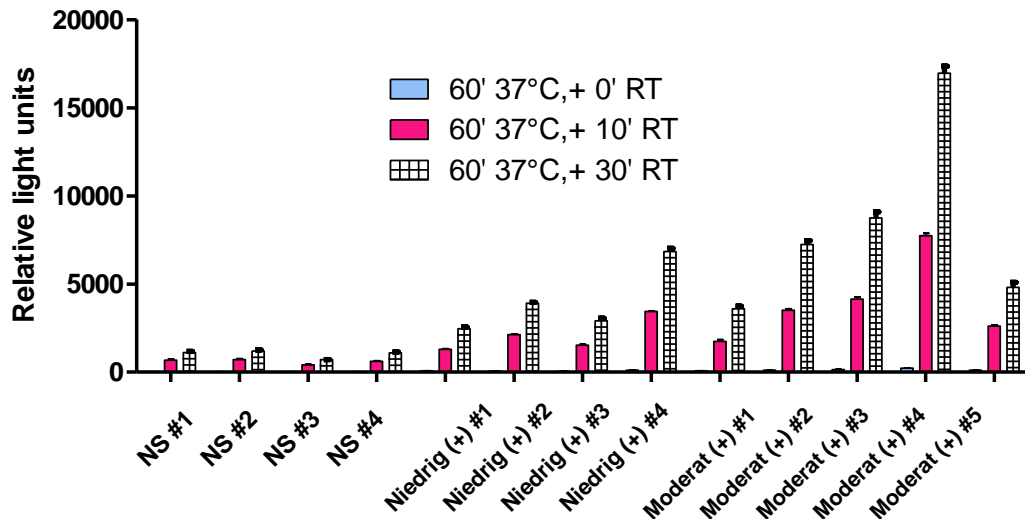
Dieser Versuch ist eine Erweiterung des zweiten Versuchs mit insgesamt 13 Proben.



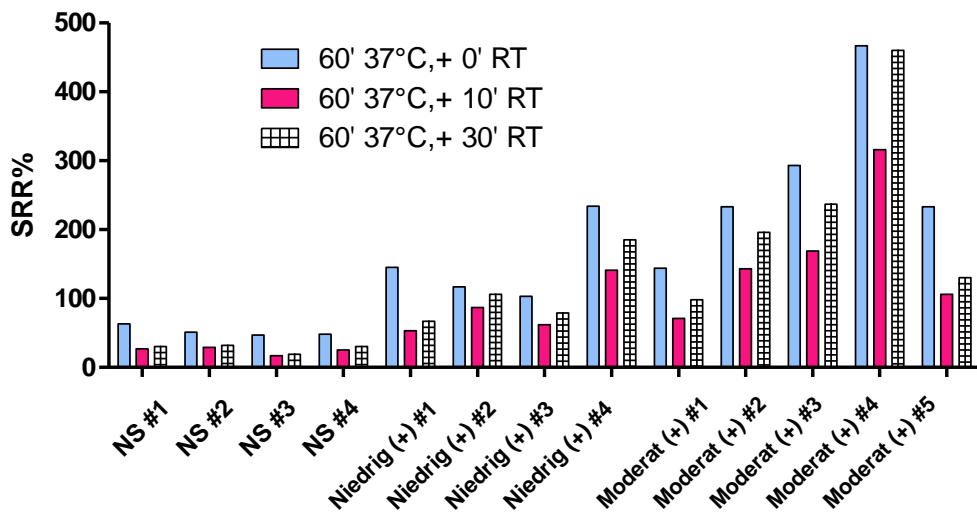
**Abb. 59 RLU-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 90 min bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.



**Abb. 60 SRR%-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min bei RT im Vergleich zu 90 min bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



**Abb. 61 RLU-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min im Inkubator mit 0, 10 und 30 min anschließender Inkubationszeit bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die Messwerte des Luminometers in RLU, wobei stets der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet ist.

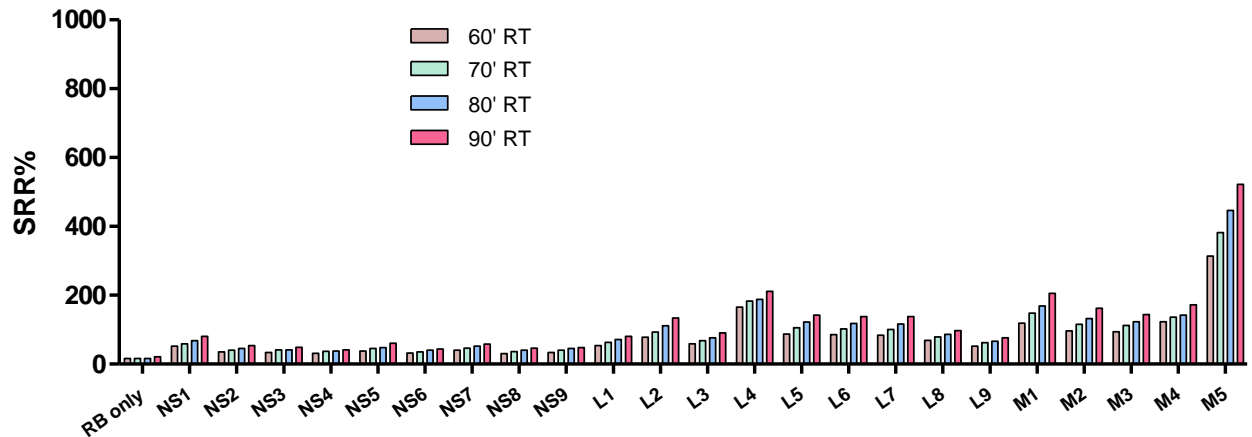


**Abb. 62 SRR%-Werte aller 13 getesteten Proben im Vergleich: 60 min im Inkubator mit 0, 10 und 30 min anschließender Inkubationszeit.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

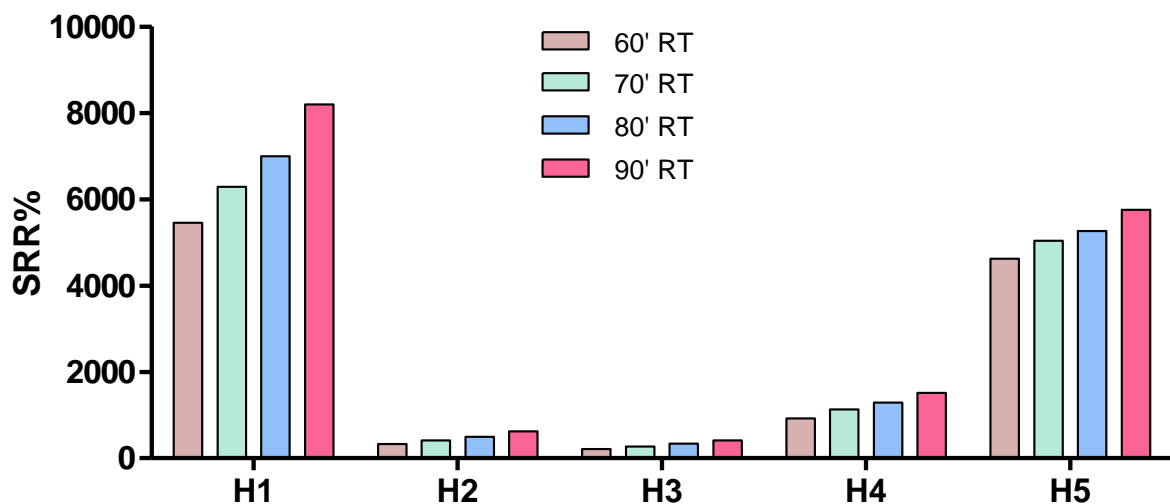


4. Versuch: Inkubation über 60 - 90 min RT vs. 60 min im Inkubator + 0/10/30 min RT, 28 Proben

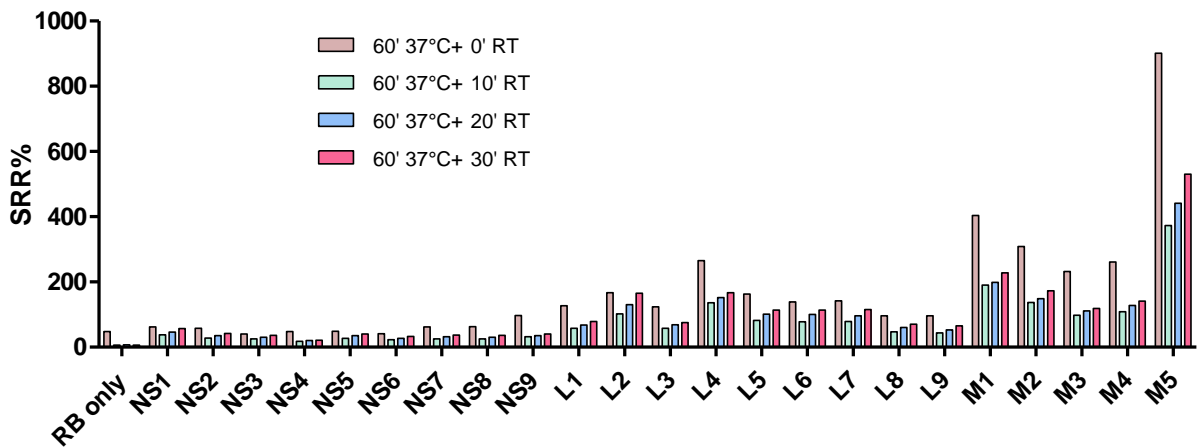
Die 28 getesteten Proben werden in SRR%-Werten dargestellt.



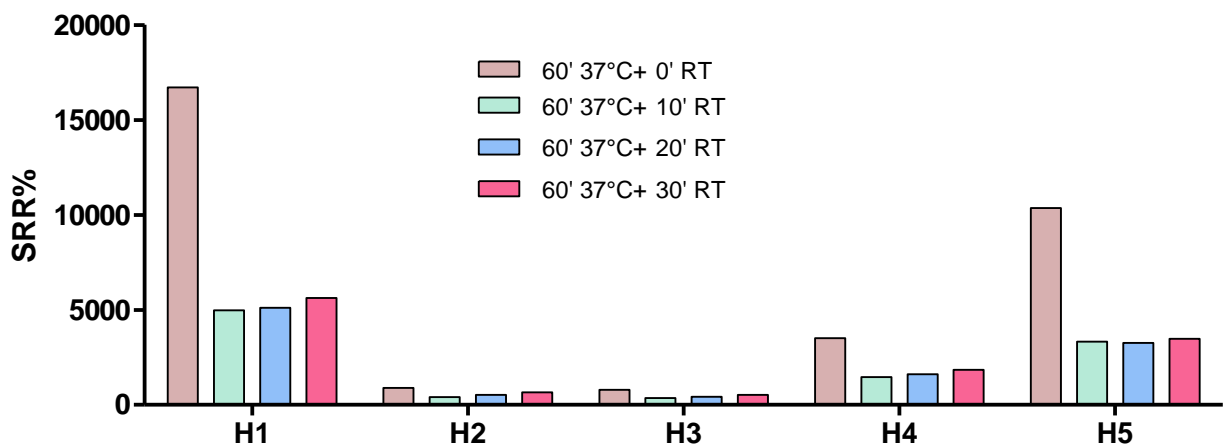
**Abb. 63 SRR%-Werte der 9 NS, 9 niedrig („l“ für „low“) und 5 moderat („m“ für „moderate“) positiven TSI-Proben nach 60, 70, 80, 90 min Inkubation bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



**Abb. 64 SRR%-Werte der 5 hochpositiven („h“ für „high“) TSI-Proben nach 60, 70, 80, 90 min Inkubation bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.



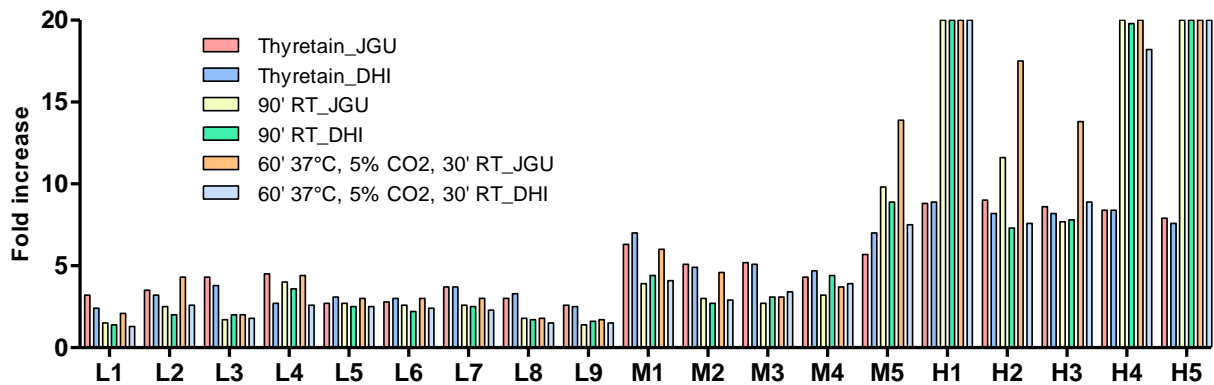
**Abb. 65 SRR%-Werte der 9 NS, 9 niedrig und 5 moderat positiven TSI-Proben nach 60 min im Inkubator + 0/10/20/30 min bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist. Ergänzt ist das Säulendiagramm um die Werte reinen RBs („RB only“).



**Abb. 66 SRR%-Werte der 5 hochpositiven TSI-Proben nach 60 min im Inkubator + 0/10/20/30 min bei RT.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die SRR%-Werte in Bezug auf die Referenzkontrolle, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist.

Vergleich mit DHI (Diagnostic Hybrids, Inc.)

Gemeinsam mit den Thyretain®-Werten wurden ausgewählte Datensätze (Inkubation bei 90 min RT und 60 min 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator + 30 min RT) der Patientenproben mit den Ergebnissen eines US-amerikanischen Vergleichslabors in einem Säulendiagramm aufgetragen. Angegeben sind die Werte als Fold Increase (vgl. Kapitel 3.2.3) auf Basis der NS-Werte.



**Abb. 67 Fold Increase der 9 niedrig, 5 moderat und 5 hochpositiven TSI-Proben im Thyretain® TSI Bioassay und im GS Assay nach 90 min RT vs. 60 min im Inkubator + 30 min bei RT im Laborvergleich.** In den Säulendiagrammen sind auf der x-Achse die Nummerierungen der jeweiligen Proben aufgetragen, die in Duplikaten gemessen wurden. Es wurde je einmalig zum Inkubationsende gemessen. Die y-Achse zeigt die Fold Increase-Werte in Bezug auf die NS, wobei stets der Mittelwert abgebildet ist („JGU“ für Johannes Gutenberg-Universität, „DHI“ für Diagnostic Hybrids, Inc.).

**Tab. 29 Tabellarische Übersicht der Fold Increase-Werte der Patientenserien des Laborvergleichs zwischen JGU und DHI (ergänzend zu Abb. 67)**

Approach (site)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Thyretain (Lab JGU)	3.2	3.5	4.3	4.5	2.7	2.8	3.7	3.0	2.6
Thyretain (DHI)	2.4	3.2	3.8	2.7	3.1	3.0	3.7	3.3	2.5
90' RT (Lab JGU)	1.5	2.5	1.7	4.0	2.7	2.6	2.6	1.8	1.4
90' RT (DHI)	1.4	2.0	2.0	3.6	2.5	2.2	2.5	1.7	1.6
60' 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 30' RT (Lab JGU)	2.1	4.3	2.0	4.4	3.0	3.0	3.0	1.8	1.7
60' 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 30' RT (DHI)	1.3	2.6	1.8	2.6	2.5	2.4	2.3	1.5	1.5

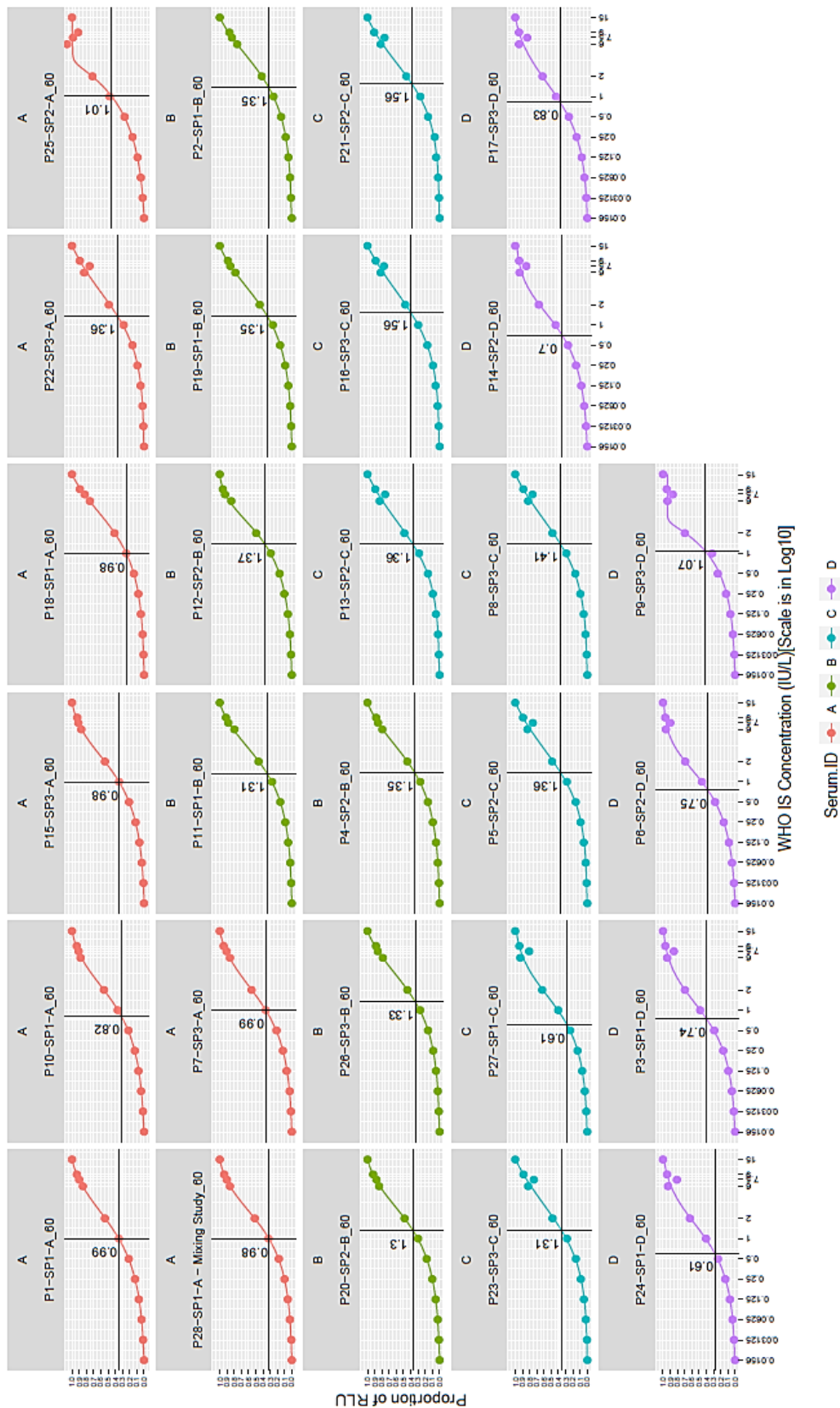
M1	M2	M3	M4	M5	H1	H2	H3	H4	H5
6.3	5.1	5.2	4.3	5.7	8.8	9.0	8.6	8.4	7.9
7.0	4.9	5.1	4.7	7.0	8.9	8.2	8.2	8.4	7.6
3.9	3.0	2.7	3.2	9.8	153.8	11.6	7.7	28.4	108.0
4.4	2.7	3.1	4.4	8.9	41.1	7.3	7.8	19.8	37.2
6.0	4.6	3.1	3.7	13.9	147.6	17.5	13.8	48.5	91.0
4.1	2.9	3.4	3.9	7.5	23.3	7.6	8.9	18.2	20.1

### **4.3 Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204)**

Die Standardisierung des neuen Assays wurde entsprechend Kapitel 3.2.6 zum einen mittels zwölf Konzentrationen des WHO IS 08/204 und zum anderen mit acht ausgewählten M22-Standardkonzentrationen durchgeführt, die den linearen Bereich umfassen. Ziel war es, die Messwerte in internationale Einheiten (IU) zu konvertieren, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen und eine Auswahl der optimalen Konzentrationen zur Kalibration zu treffen. Die Kalibrationskurven sind nach dem 5PL-Modell (Five Parameters Logistic Regression) einer nichtlinearen Regression angefertigt, um Asymmetrien von Dosis-Wirkungskurven auszugleichen.

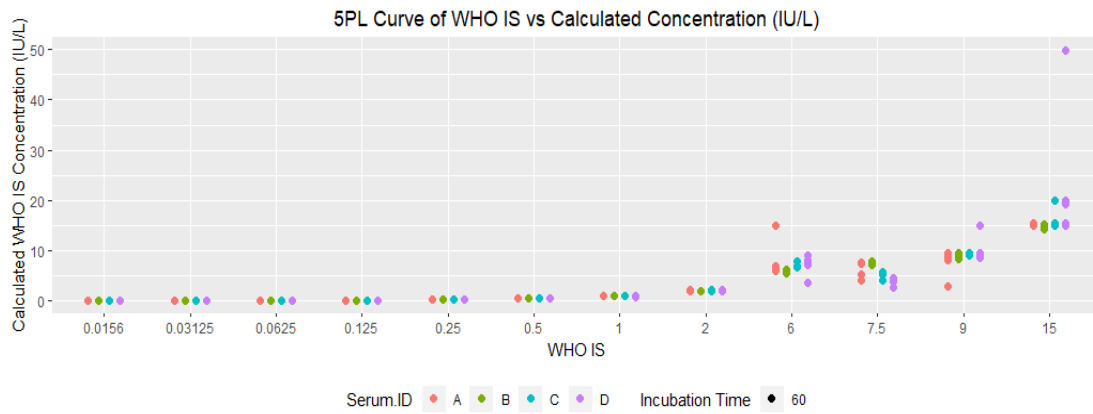
Zunächst werden die Ergebnisse der 28 gemessenen Platten dargestellt, die nach Kalibrierung mit dem WHO IS erreicht werden konnten.

Es wurde ein Messzeitpunkt von 60 min gewählt.

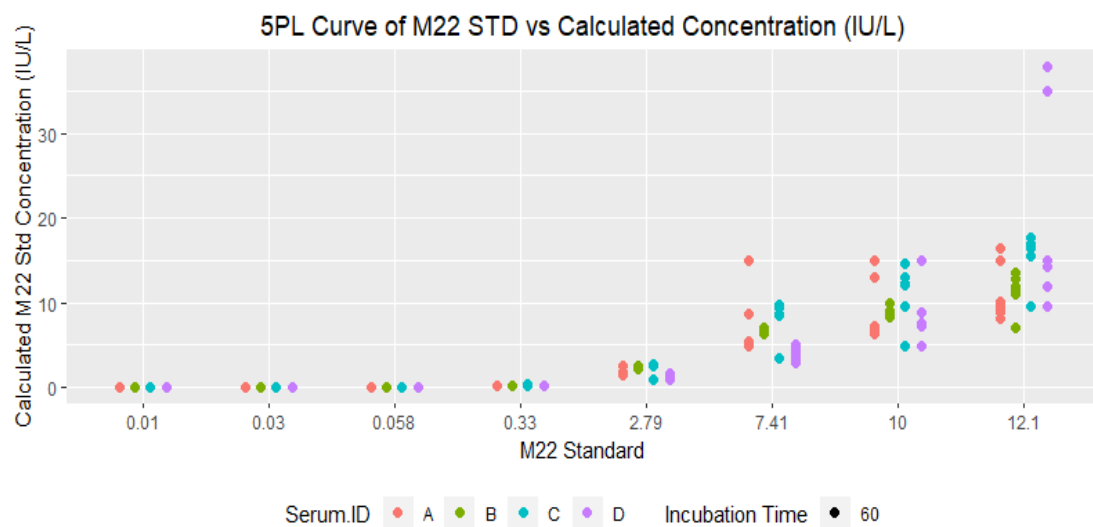


**Abb. 68** Kalibrationskurven anhand von 12 WHO IS-Konzentrationen auf 28 Platten nach 60 min Messzeit mit Eintrag der hochpositiven Kontrolle, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 12 IS-Konzentrationen (0,0156 - 15 IU/L) in logarithmischem Auftrag; die y-Achse das RLU-Verhältnis, wobei ein Bereich zwischen den niedrigsten und höchsten RLU-Werten der Standards abgebildet ist. Im grauen Balken ist die jeweilige Plattennummerierung 1 - 28 mit den jeweiligen Serumpanels 1 - 3 und dem WHO-Panel A - D (auch farbig in der Legende gekennzeichnet) zu sehen. Die senkrechte Eintragung entspricht der errechneten Konzentration der hochpositiven Kontrolle in IU/L.

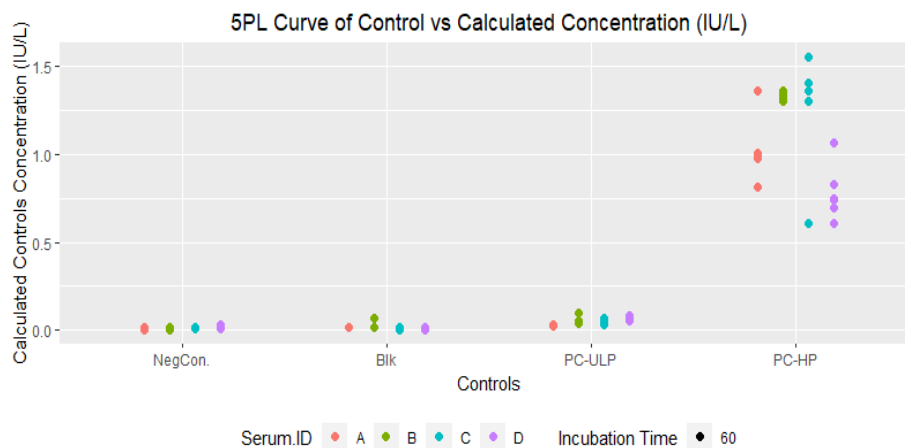
## 4 Ergebnisse



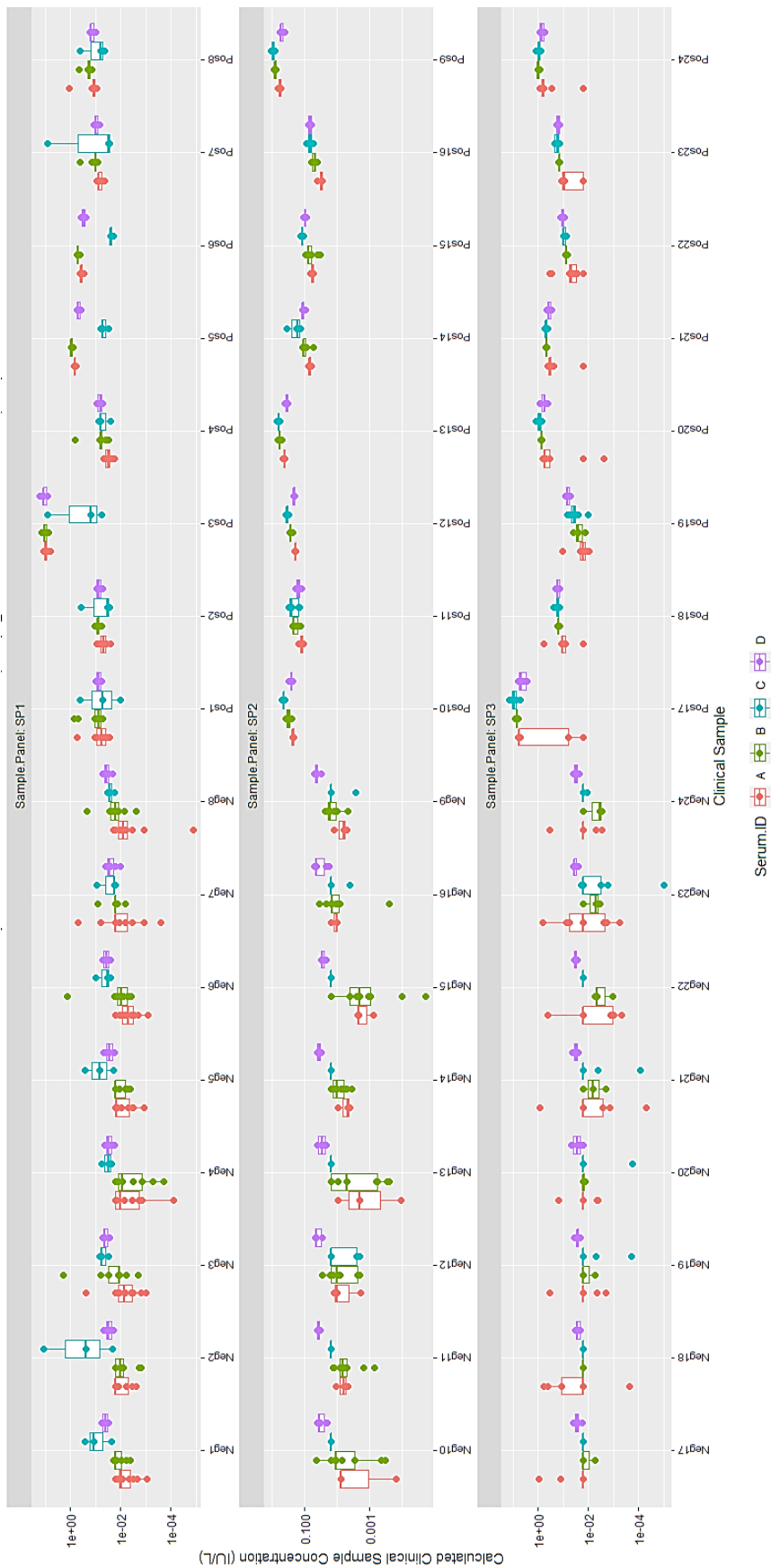
**Abb. 69** Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 12 WHO IS-Konzentrationen anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 12 IS-Konzentrationen (0,0156 - 15 IU/L); die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die Serumpanels A - D.



**Abb. 70** Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 8 M22-Standardkonzentrationen anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 8 Standardkonzentrationen (0,01 - 12,1 IU/L); die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die Serumpanels A - D.



**Abb. 71** Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 4 Kontrollen (negativ („neg.“), Blank (BIK), niedrigstpositiv („ULP“, „ultra low positive“), hochpositiv („HP“, „high positive“)) anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 4 Kontrollen; die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die Serumpanels A - D.

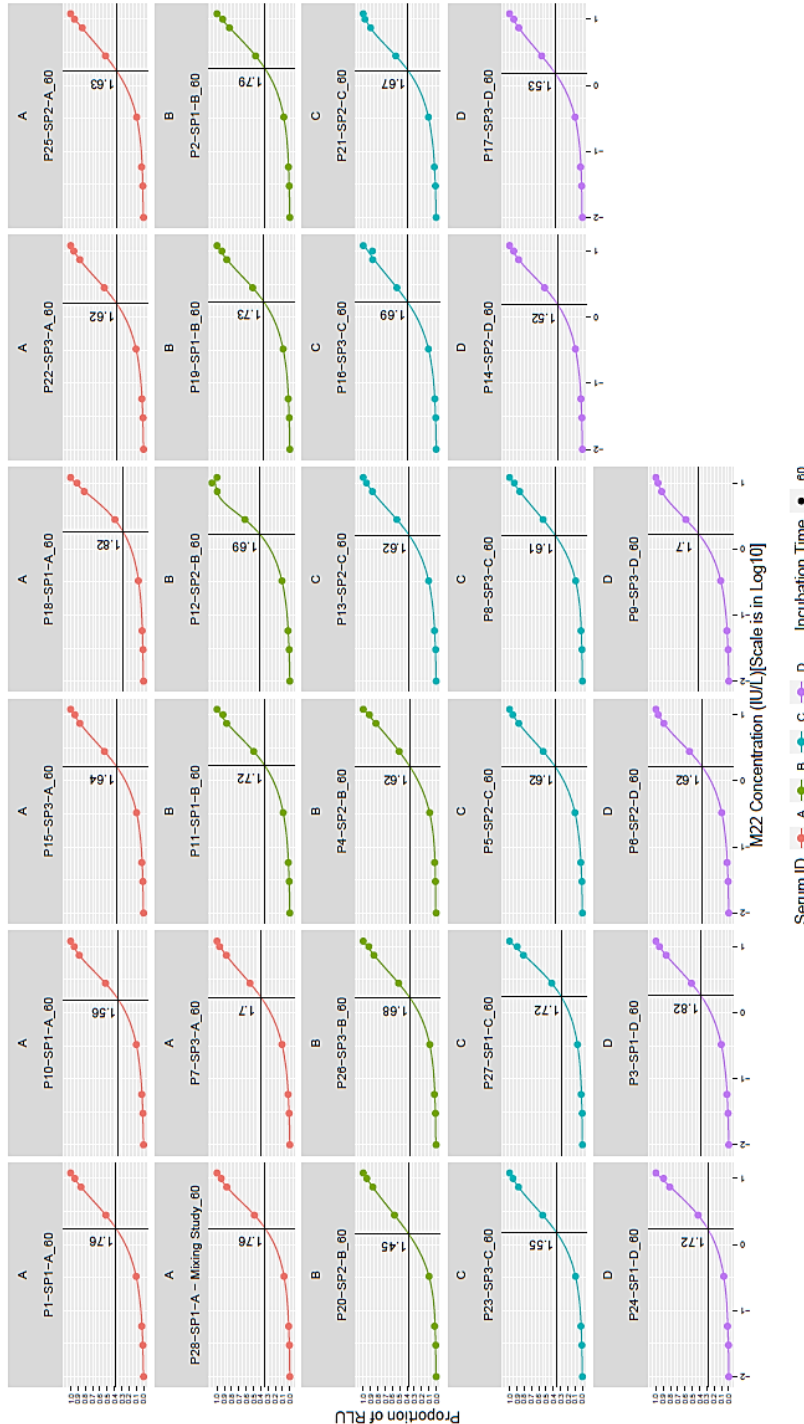


**Abb. 72** Verteilung der errechneten IU/L-Werte aller 24 negativen und 24 positiven Proben anhand WHO IS-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die Nummerierung der Seren; die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die Serumpanels A - D. Box-Whisker-Plots stellen die Verteilung der Replikate in den verschiedenen Serumpanels inklusive Minimum und Maximum dar.

#### 4 Ergebnisse

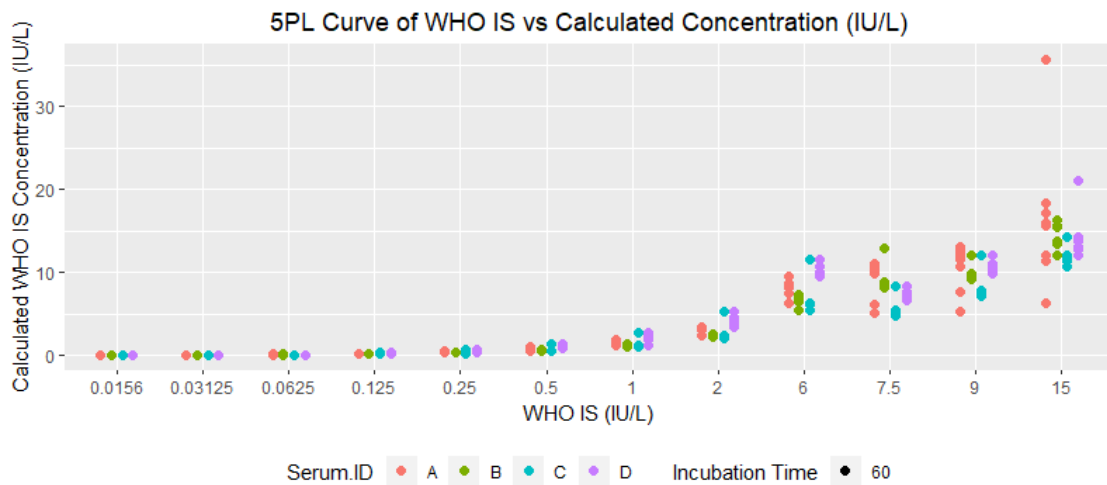
Nun sollen in einem zweiten Schritt die Ergebnisse präsentiert werden, die nach Kalibrierung mit den acht ausgewählten M22-Standardkonzentrationen gewonnen werden konnten.

Es wurde gleichermaßen ein Messzeitpunkt von 60 min gewählt.

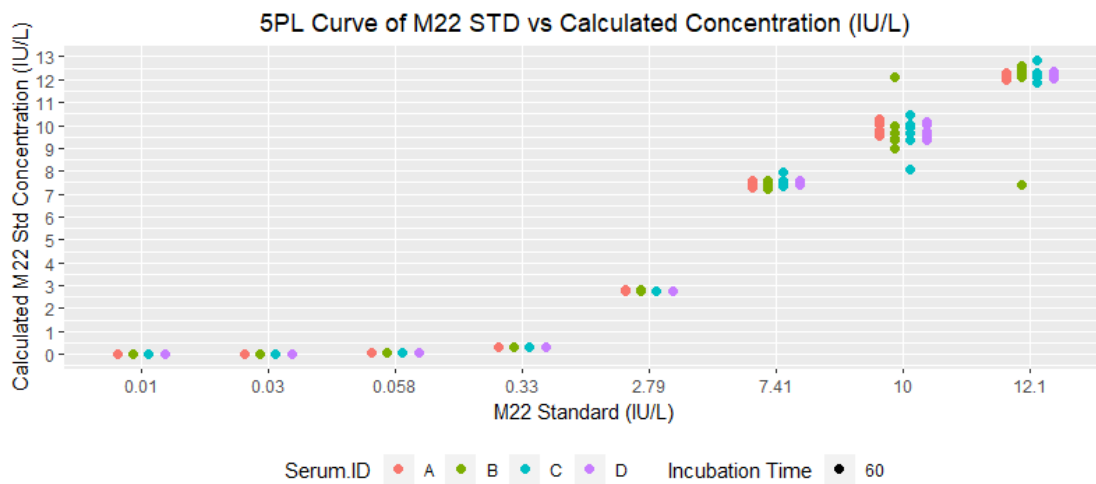


**Abb. 73** Kalibrationskurven anhand von 8 M22-Standardkonzentrationen auf 28 Platten nach 60 min Messzeit mit Eintrag der hochpositiven Kontrolle, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 8 M22-Standardkonzentrationen (0,01 - 12,1 IU/L) in logarithmischem Auftrag; die y-Achse das RLU-Verhältnis, wobei ein Bereich zwischen den niedrigsten und höchsten RLU-Werten der Standards abgebildet ist. Im grauen Balken ist die jeweilige Plattennummerierung 1 - 28 mit den jeweiligen Serumpanels 1 - 3 und dem WHO-Panel A - D (auch farbig in der Legende gekennzeichnet) zu sehen. Die senkrechte Eintragung entspricht der errechneten Konzentration der hochpositiven Kontrolle in IU/L.

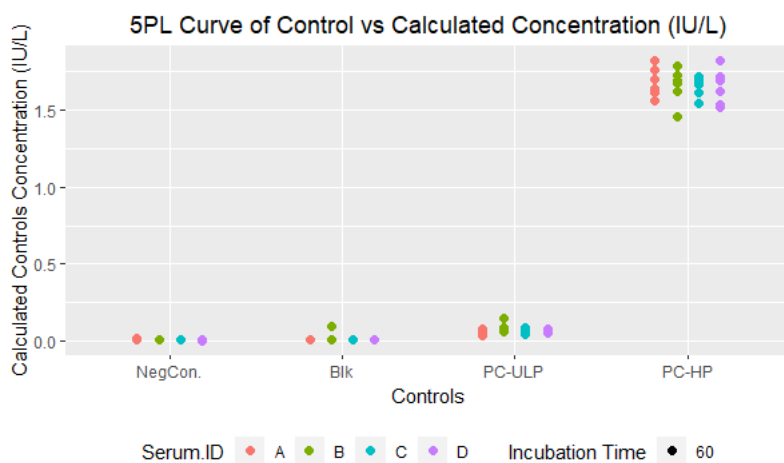




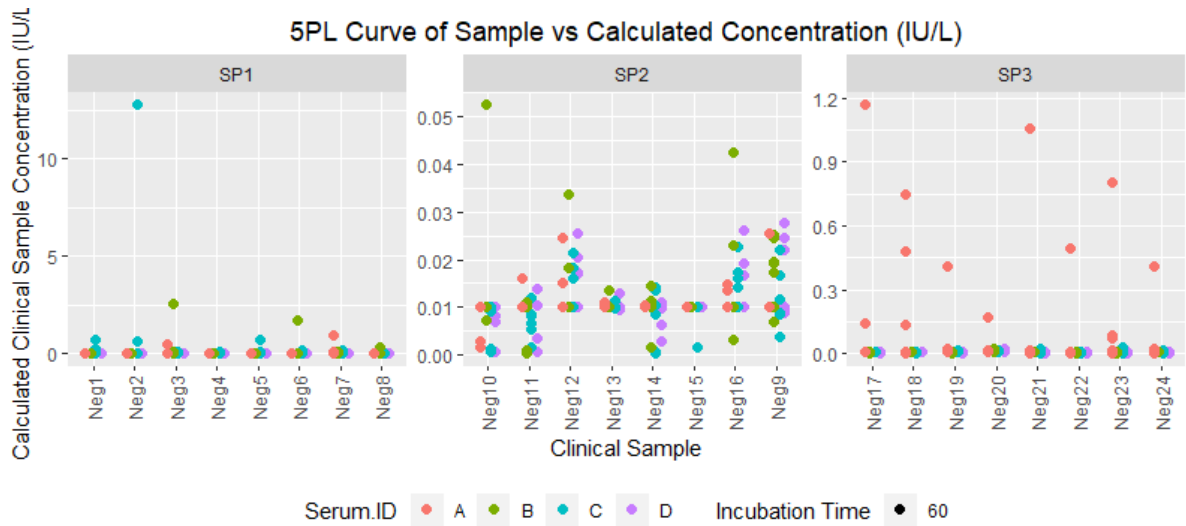
**Abb. 74** Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 12 WHO IS-Konzentrationen anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 12 IS-Konzentrationen (0,0156 - 15 IU/L); die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die WHO-Panels A - D.



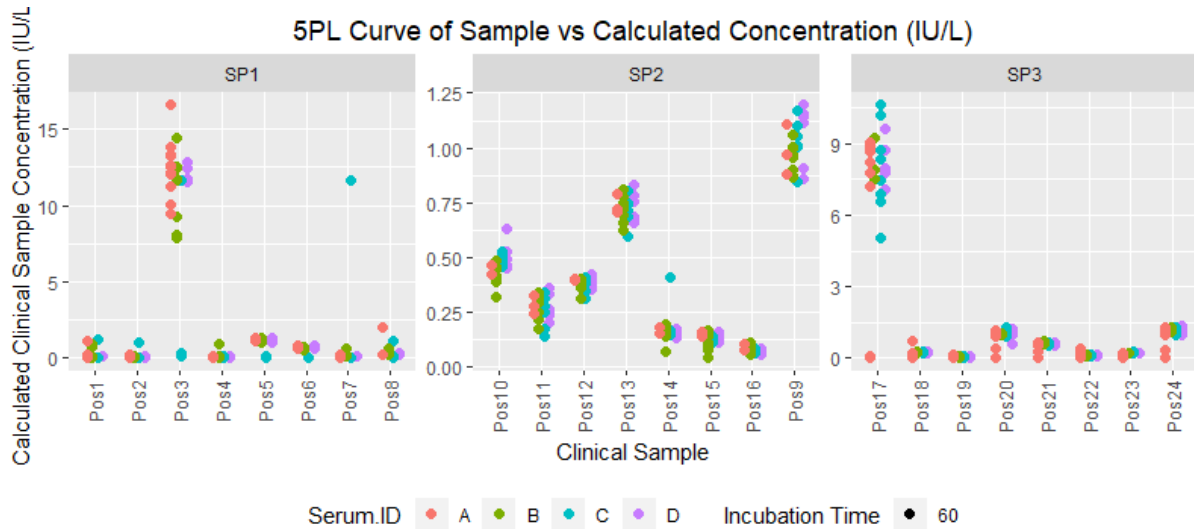
**Abb. 75** Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 8 M22-Standardkonzentrationen anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 8 Standardkonzentrationen (0,01 - 12,1 IU/L); die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die WHO-Panels A - D.



**Abb. 76** Verteilung der errechneten IU/L-Werte der 4 Kontrollen anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 4 Kontrollen; die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die WHO-Panels A - D.



**Abb. 77** Verteilung der errechneten IU/L-Werte aller 24 negativen Proben anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die Nummerierung der Seren; die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die WHO-Panels A - D.

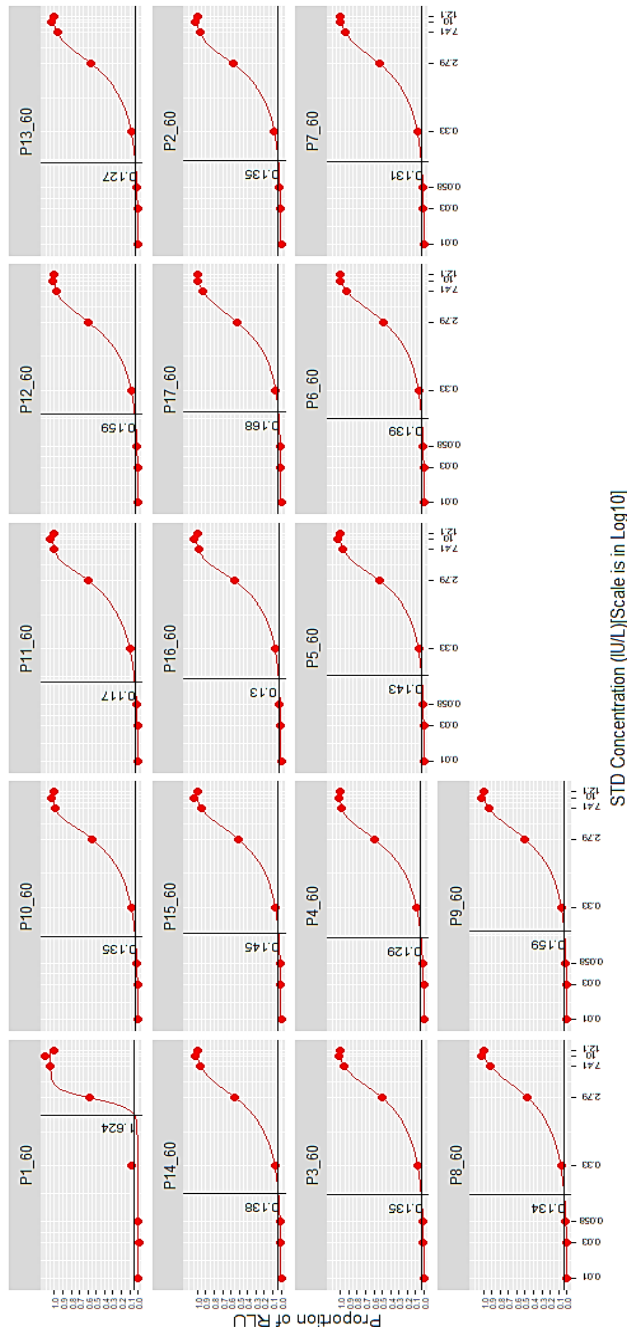


**Abb. 78** Verteilung der errechneten IU/L-Werte aller 24 positiven Proben anhand M22-Standard-Kalibrationskurve nach 60 min Messzeit, 5-PL. Die x-Achse zeigt die Nummerierung der Seren; die y-Achse die errechneten Konzentrationen in IU/L. Die Legende zeigt die farbliche Einteilung der Werte in die WHO-Panels A - D.

## 4.4 Testung von Sensitivität und Spezifität

Wie in Kapitel 3.2.7 erläutert, erfolgte in dieser Studie die Testung von 225 Immulite®-positiven und 176 Immulite®-negativen Proben gemeinsam mit den acht Standards (s. Tab. 20) auf 17 Platten zur Testung von Sensitivität und Spezifität.

Zunächst sind an dieser Stelle die Kalibrationskurven aller Platten für einen Messzeitpunkt nach 60 min Inkubation gezeigt:

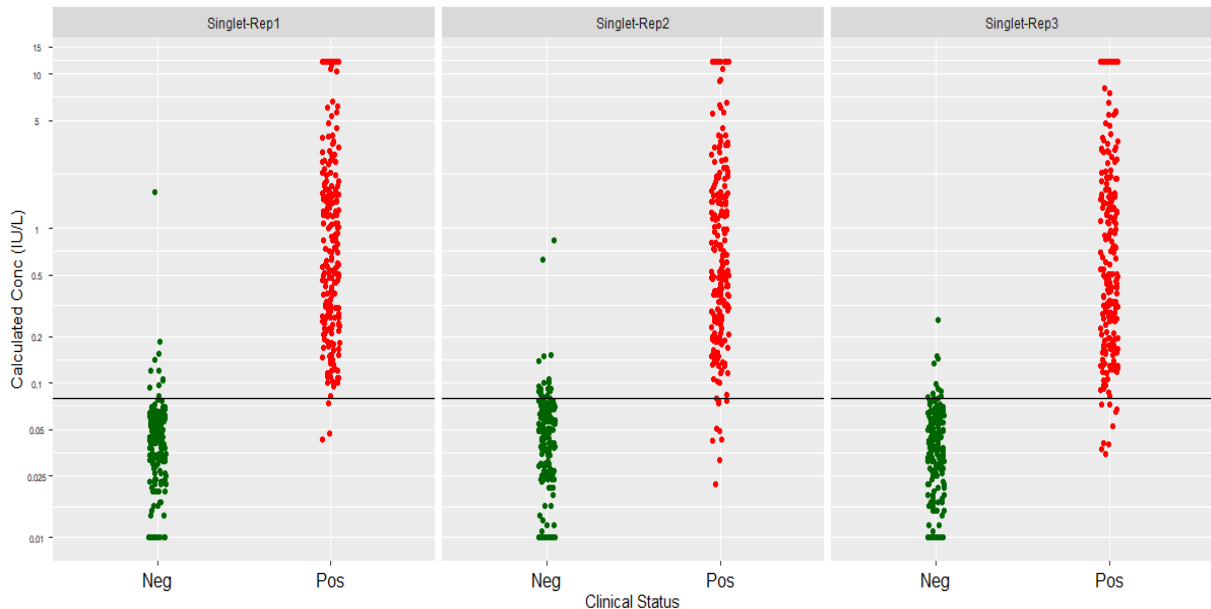


**Abb. 79** Kalibrationskurven anhand von 8 M22-Standardkonzentrationen auf 17 Platten nach 60 min Messzeit mit Eintrag der niedrigstpositiven Kontrolle, 5-PL. Die x-Achse zeigt die 8 Standardkonzentrationen (0,01 - 12,1 IU/L) in logarithmischem Auftrag; die y-Achse das RLU-Verhältnis, wobei ein Bereich zwischen den niedrigsten und höchsten RLU-Werten der Standards abgebildet ist. Im grauen Balken ist die jeweilige Plattennummerierung 1 - 17 zu sehen. Die senkrechte Eintragung entspricht der errechneten Konzentration der niedrigstpositiven Kontrolle in IU/L.

#### 4 Ergebnisse

Abgesehen von Platte 1 kann der Assay laut diesen Daten bis zu einer Konzentration von 12,1 IU/L bei 60 min Messzeit in Bezug auf die RLU-Werte verwandt werden.

Als nächstes wurden Spezifität und Sensitivität der getesteten klinischen Proben anhand der einzelnen Replikate (insgesamt: Testung in Triplikaten) nach 60 min Messzeit errechnet.



**Abb. 80** Verteilung der getesteten Proben nach errechneter Konzentration in IU/L, Einteilung nach Replikaten nach 60 min Messzeit. Die x-Achse zeigt die Einteilung der Proben in positiv und negativ entsprechend ihres klinischen Status (Immulate®). Der Cut-off des neuen Assays von 0,08 IU/L ist in einer schwarzen horizontalen Linie aufgetragen. Die y-Achse zeigt die errechnete Konzentration in IU/L. Im grauen Balken oberhalb ist die jeweilige Replikatnummer 1 - 3 zu sehen.

**Tab. 30 + 31** Vier-Felder-Tafel für Replikat 1 und Replikat 2 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min

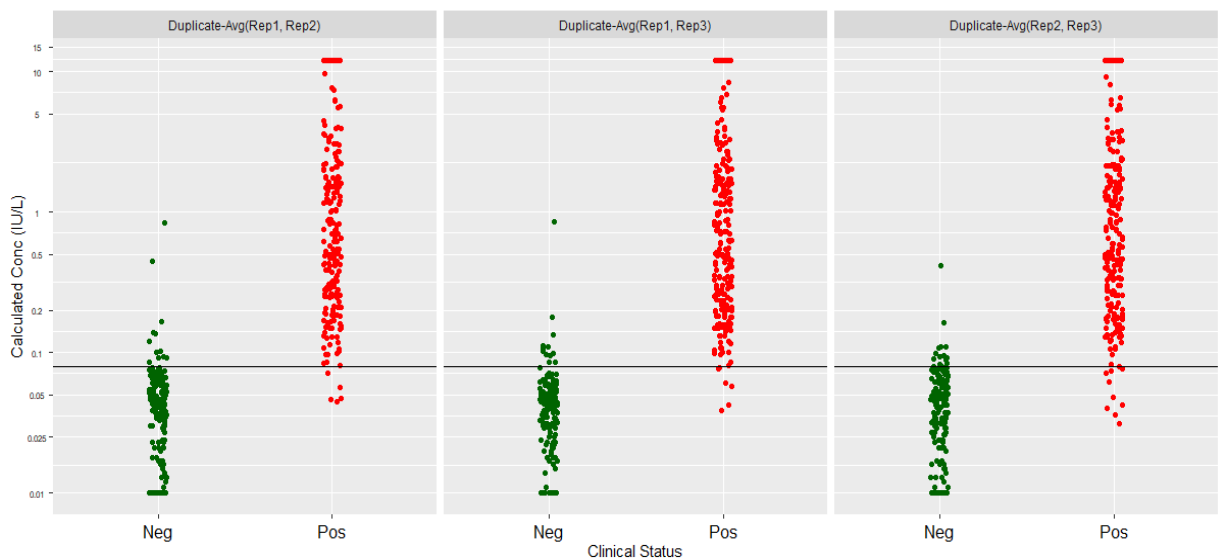
Replikat 1 vs. klinischer Status				Replikat 2 vs. klinischer Status			
(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total	(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total
	Negativ	Positiv			Negativ	Positiv	
Negativ	165	3	168	Negativ	155	9	164
Positiv	11	223	234	Positiv	21	217	238
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>226</b>	<b>402</b>	<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>226</b>	<b>402</b>
<b>Spezifität</b>	<b>93,8 % (165/176)</b>			<b>Spezifität</b>	<b>88,1 % (155/176)</b>		
<b>Sensitivität</b>	<b>98,7 % (223/226)</b>			<b>Sensitivität</b>	<b>96,0 % (217/226)</b>		

#### 4 Ergebnisse

**Tab. 32 Vier-Felder-Tafel für Replikat 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min**

Replikat 3 vs. klinischer Status			
(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	165	9	174
Positiv	11	217	228
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>226</b>	<b>402</b>
<b>Spezifität</b>	<b>93,8 % (165/176)</b>		
<b>Sensitivität</b>	<b>96,0 % (217/226)</b>		

Auf entsprechende Weise wurde mit dem Mittelwert von zwei der drei Replikate verfahren.



**Abb. 81 Verteilung der getesteten Proben nach errechneter Konzentration in IU/L, Einteilung nach Mittelwert von 2 von 3 Replikaten nach 60 min Messzeit.** Die x-Achse zeigt die Einteilung der Proben in positiv und negativ entsprechend ihres klinischen Status (Immulate®). Der Cut-off des neuen Assays von 0,08 IU/L ist in einer schwarzen horizontalen Linie aufgetragen. Die y-Achse zeigt die errechnete Konzentration in IU/L. Im grauen Balken oberhalb ist jeweils aufgetragen, aus welchen beiden Replikaten sich der Mittelwert errechnet.

**Tab. 33 + 34 Vier-Felder-Tafel für Replikat 1 + 2 und 1 + 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min**

Mittelwert (Replikat 1, Replikat 2) vs. klinischer Status				Mittelwert (Replikat 1, Replikat 3) vs. klinischer Status			
(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total	(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total
	Negativ	Positiv			Negativ	Positiv	
Negativ	164	5	169	Negativ	164	6	170
Positiv	12	221	133	Positiv	12	220	132
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>226</b>	<b>402</b>	<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>226</b>	<b>402</b>
<b>Spezifität</b>	<b>93,2 % (164/176)</b>			<b>Spezifität</b>	<b>93,2 % (164/176)</b>		
<b>Sensitivität</b>	<b>97,8 % (221/226)</b>			<b>Sensitivität</b>	<b>97,4 % (220/226)</b>		

Tab. 35 Vier-Felder-Tafel für Replik 2 + 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min

Mittelwert (Replik 2, Replik 3) vs. klinischer Status			
(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	163	10	173
Positiv	13	216	229
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>226</b>	<b>402</b>
<b>Spezifität</b>	<b>92,6 % (163/176)</b>		
<b>Sensitivität</b>	<b>95,6 % (216/226)</b>		

Letztendlich wird das Prozedere für den Mittelwert aus allen drei Replikaten angewandt:

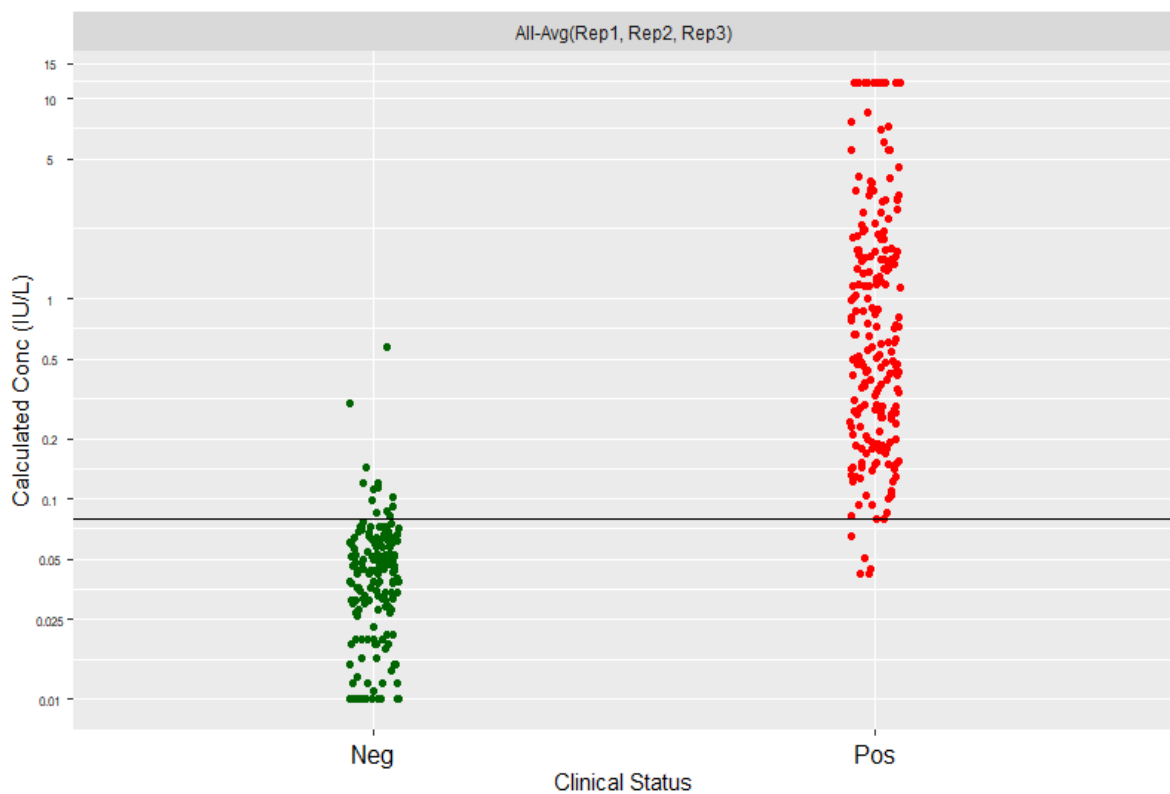


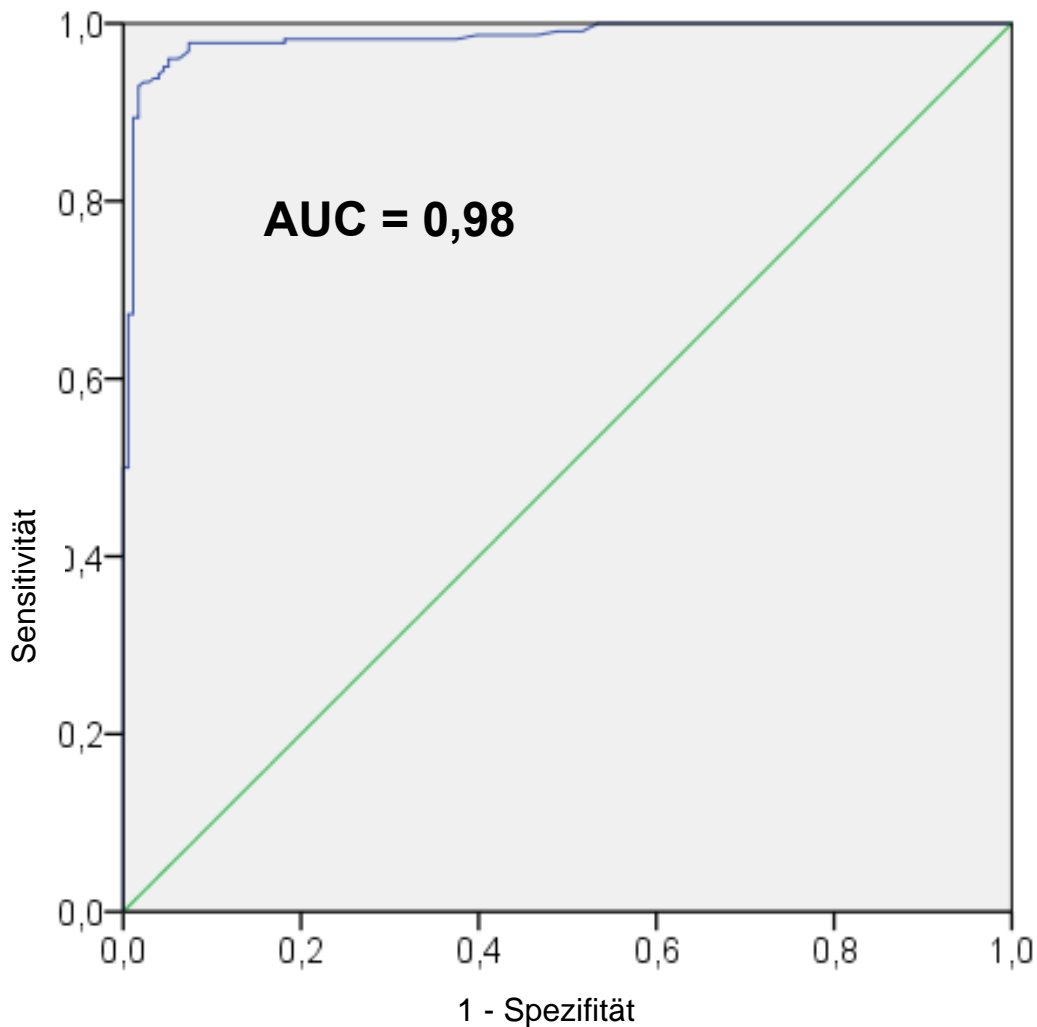
Abb. 82 Verteilung der getesteten Proben nach errechneter Konzentration in IU/L, Einteilung nach Mittelwert von 3 Replikaten nach 60 min Messzeit. Die x-Achse zeigt die Einteilung der Proben in positiv und negativ entsprechend ihres klinischen Status (Immulate®). Der Cut-off des neuen Assays von 0,08 IU/L ist in einer schwarzen horizontalen Linie aufgetragen. Die y-Achse zeigt die errechnete Konzentration in IU/L.

#### 4 Ergebnisse

**Tab. 36 Vier-Felder-Tafel für Replikat 1 + 2 + 3 mit Errechnung von Spezifität und Sensitivität, 60 min**

Mittelwert (Replikat 1, Replikat 2, Replikat 3) vs. klinischer Status			
(Cut-off = 0,08 IU/l)	klinischer Status		Total
	Negativ	Positiv	
Negativ	163	7	170
Positiv	13	219	232
Total	176	226	402
Spezifität	92,6 % (163/176)		
Sensitivität	97,0 % (219/226)		

Schließlich sind die Ergebnisse in einer Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) zusammengefasst:



**Abb. 83 Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve): Sensitivität und Spezifität.** Die x-Achse zeigt die Spezifität subtrahiert von 1, was der Falsch-Positiv-Rate entspricht; die y-Achse die Sensitivität. Die grüne Linearfunktion entspricht zufälligen Zuweisungen, während der blaue Graph den Ergebnissen des Assays entspricht. Die AUC (Area Under the Curve) beträgt 0,98. Gezeigt sind die Ergebnisse für alle Triplikate.

## 5 Diskussion

Diese Arbeit beabsichtigt, einen Assay vorzustellen, der durch indirekte cAMP-Messung die Höhe der TSI-Konzentrationen in Seren von MB-Patienten detektiert und zudem eine vereinfachte und zeitsparende Handhabung im Vergleich zu früheren Methoden bietet. Im Laufe seiner Entwicklung wurden diverse Einflussfaktoren wie beispielsweise Zellwachstums- und Inkubationszeit angepasst; es wurde mit monoklonalen Antikörpern, euthyreoten Kontrollen und Patientenseren stimuliert und Qualitätskriterien wie Reproduzierbarkeit sowie Spezifität und Sensitivität untersucht. Zudem erfolgte eine Standardisierung in internationale Einheiten pro Liter, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Studien und Laboratorien zu gewährleisten und den diagnostischen Prozess einfacher zu gestalten.

### 5.1 Stimulation mit monoklonalen Antikörpern: M22, K1-70

Als zu Beginn der Versuche der spezifische TSH-R-Stimulator M22 in Verdünnungen in NS und RB aufgetragen wurde, konnte bereits ohne tiefgreifende Modifikationen des Protokolls eine größtenteils vollständige Dosis-Wirkungskurve für die Verdünnung in NS erzielt werden (vgl. Abb. 8, 10, 11), wobei nur für einen Messzeitpunkt von 10 min das untere Plateau mit der Verdünnungsspanne von 0,39 bis 400 ng/ml M22 nicht erreicht wurde. Insgesamt zeigte sich, dass NS als Verdünnungsmedium weitaus höhere RLU-Werte im Luminometer ergab als RB: So präsentierten sich die RLU-Werte bei einer Konzentration von 100 ng/ml M22 zu einem Messzeitpunkt von 10 min in NS als nahezu dreifach so hoch wie in RB und bei einem Messzeitpunkt von 60 min der gleichen Konzentration sogar 3,8fach so hoch (vgl. Kapitel 4.1.1), was auch vermuten lässt, dass die RLU-Werte in NS ein weiteres Entwicklungsspektrum aufweisen als die RB-Werte. Interessant ist zudem, dass die M22-Konzentrationen von 400 und 200 ng/ml entfernt werden mussten, um eine eindeutige Dosis-Wirkungskurve für die RB-Verdünnung zu erzielen und entsprechende Werte der mittleren effektiven Konzentration zu errechnen (Abb. 8, 9: inkl. 400 und 200 ng/ml M22 in RB, Abb. 12, 13: exkl. 400 und 200 ng/ml M22 in RB). Nach 10 min Messzeit der Konzentrationen in RB (Abb. 9) fällt zudem der ab einer M22-Konzentration von 50 ng/ml eintretende abfallende Verlauf der RLU-Werte auf, obwohl die Konzentrationen ansteigen und sich in entsprechender Weise die stimulierende Aktivität erhöhen sollte. Es könnte in diesem Fall über einen möglichen High-Dose-Hook-Effekt, bei dem paradox niedrige Werte bei erhöhter Konzentration des Antigens gemessen werden, oder eine zu



geringe Gewöhnungszeit an RT spekuliert werden. Betrachtet man außerdem die in den Graphen eingetragenen Standardfehler aus den Duplikaten, fällt auf, dass die Werte des NS sich deutlich homogener und ohne größere Streuung präsentieren (besonders deutlich im Vergleich von Abb. 10 zu Abb. 12). Auch die graphischen Darstellungen des S/B Ratio (Abb. 14, 15) belegen diese Erkenntnisse, zumal die Variabilität der RLU-Werte des reinen RB im Gegensatz zu reinem NS, was je als Hintergrund diente, aufgrund der geringeren Höhe der Werte größer sein muss. Unter dem Gesichtspunkt der in Tab. 6 aufgeführten Optimierungsparameter lässt sich außerdem festhalten, dass ein Messzeitpunkt von 10 min deutlich geringere RLU-Werte erbringt als die Messzeitpunkte 20 - 60 min, deren Dosis-Wirkungskurven sich zu einigen Teilen nahezu überlagern (vgl. Abb. 11).

Insgesamt kann man also von einer besseren Eignung des NS als Verdünnungsmedium für den spezifischen monoklonalen, stimulierenden Antikörper M22 gegenüber RB ausgehen, vor allem aufgrund der höheren RLU-Werte und des geringeren Standardfehlers. Um die Leistungsfähigkeit des vorliegenden Assays auf der Ebene der M22-Stimulation zu vergleichen, bietet es sich an, zwei Arbeiten der Mainzer Arbeitsgruppe heranzuziehen (Leschik, Diana et al. 2013, Diana, Olivo et al. 2019). In der erstgenannten Publikation wird eine M22-Dosis-Wirkungskurve für den Thyretain® TSI Bioassay in den Konzentrationen 0,003 bis 100 ng/ml in NS gezeigt, allerdings unter Angabe der SRR%-Werte auf der y-Achse (Leschik, Diana et al. 2013). Interessant ist auch die Verdünnung von M22 in einer Arbeit in naher Vergangenheit, die das in der Literatordiskussion erwähnte cAMP-Assay via DNA-bindender Proteine mit dem Thyretain®-Assay vergleicht (Diana, Olivo et al. 2019). In Konzentrationen von 0,006 - 50 ng/ml ist M22 diesmal in RB verdünnt dargestellt, das cAMP-Assay mit Werten der Relativen Fluoreszenz auf der y-Achse, das TSI Bioassay mit RLU-Werten auf der y-Achse, sodass ein Vergleich mit dem in dieser Arbeit behandelten Assay möglich ist, wobei selbstverständlich die chimärischen CHO Mc4-Zellen für diesen Vergleich relevant sind.

Bevor auf die blockierende Wirkung des monoklonalen Antikörpers K1-70 eingegangen werden soll, bietet sich die Betrachtung der Ergebnisse aus Kapitel 4.1.3 an, da anhand der Dosis-Wirkungskurven der Einfluss der veränderten Parameter im Protokoll beurteilt werden kann. Mittlerweile hat sich das Protokoll in der Hinsicht verändert, dass die Zellen nicht mehr mit Wachstumsmedium angereichert werden und ein Zellwachstum stattfindet; stattdessen werden die Zellen direkt in das GS cAMP Reagenz gegeben und dann mitsamt der Proben inkubiert. Zudem unterscheiden sich

die im Folgenden diskutierten Versuche dadurch von den obigen, dass die Zellanzahl verdoppelt wurde, um die Wahrscheinlichkeit der höheren Lichtsignalausgabe zu erhöhen ( $3,5 \times 10^6$  Zellen vs.  $7 \times 10^6$  Zellen). SRR%-Werte werden mithilfe der neuen GS Referenzkontrolle berechnet. Aufgrund der im obigen Absatz diskutierten Ergebnisse wurde NS als Verdünnungsmedium gewählt.

Zunächst wurde ein M22-Konzentrationspektrum von 0,195 - 200 ng/ml gewählt. Schon anhand der an die RLU-Werte angepassten Skala der y-Achse fällt auf, dass die Werte deutlich geringer ausfallen als bei der anfangs durchgeführten ON-Wachstumszeit, was sicherlich der Zellkonfluenz zuzuschreiben ist, die bereits nach 2 oder 3 h Zellwachstumszeit wesentlich geringer ist als nach ON-Wachstumszeit (vgl. Abb. 47). Dennoch lassen sich die Dosis-Wirkungskurven nach 60 min Inkubationszeit im Inkubator gut in Abhängigkeit von der Messzeit differenzieren (Abb. 24), während nach 120 min Inkubationszeit im Inkubator schon bei geringen M22-Konzentrationen ein Plateau erreicht ist (Abb. 25), sodass von einer solch langen Inkubationszeit Abstand genommen wurde. Trotzdem bestätigt der erwünschte sigmoidale Verlauf der Dosis-Wirkungskurven ohne Zellwachstumszeit die Funktionalität des Assays auch unter dieser für ein Labor einfacher und weniger fehleranfällig handzuhabenden Veränderung. Die Abb. 24 bis 27 zeigen, dass für zukünftige Versuche mit M22 der Konzentrationsbereich eher niedriger gewählt werden sollte und die Messung höherer Konzentrationen aufgrund der Plateaubildung zu keinem neuen Erkenntnisgewinn führen würde. So wurden für die folgenden Versuche, in denen die Inkubation der Platten im Inkubator der Inkubation bei RT gegenübergestellt wurde, M22-Konzentrationen von 0,01 - 50 ng/ml bzw. 0,2 - 100 ng/ml gewählt. Ziel war es nun, die Notwendigkeit der Inkubatorbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) zu überprüfen. Es zeigte sich, dass der Kurvenverlauf von 60 min RT und 60 min im Inkubator plus 30 min RT sich ähnlich gestaltet. Die RLU-Werte bei reiner RT bleiben vorerst niedriger; so sind sie bei einer M22-Konzentration von 6,25 ng/ml bei 30 min Messzeit nahezu halb so hoch wie auf der Vergleichsplatte (Inkubator + RT), wie Abb. 28 zeigt. Im Verlauf jedoch ist die bei RT inkubierte Platte in der Lage, bei höheren Konzentrationen eine Differenz von unter 20.000 RLU im Vergleich zur im Inkubator und bei RT inkubierten Platte zu erreichen (Abb. 28). Die SRR%-Werte zeigen in den höheren Konzentrationen jedoch ein anderes Bild, da die zur Berechnung verwandte GS Referenzkontrolle in NS in der Platte bei 60 min RT im Verhältnis zu den M22-Proben weniger stark angestiegen ist als in der Inkubator-RT-Platte, sodass sich hier höhere SRR%-Werte finden lassen (vgl. Abb. 29). Eine längere Inkubation bei RT (hier: 90

min) scheint zwar auf den ersten Blick ungünstig zu sein, denn bereits bei geringen Konzentrationen fallen die RLU-Werte niedriger aus, was eine eingeschränkte Dosis-Wirkungskurve nach sich zieht (Abb. 30). Die SRR%-Werte allerdings zeigen für 90 min RT höhere Werte (Abb. 31). Interessant ist auch die Erkenntnis, dass die inkubierten Zellen deutlich höhere Lichtsignale produzieren, wenn sie eine gewisse Zeit bei RT verbringen: Das Versuchsmodell 60 min Inkubator plus 0 min bei RT mutet in den Abb. 32 und 33 fast wie eine lineare Funktion an, es werden im Vergleich zur Referenzkontrolle kaum Lichtsignale aus den Wells mit den M22-Konzentrationen abgegeben und die Verteilung der Mittelwerte folgt nicht dem erwarteten sigmoidalen Verlauf. Nach 10 min bei RT zusätzlich zum Inkubator liegen die Lichtsignale noch nicht in der Höhe wie nach 30 min bei zusätzlicher RT (vgl. Abb. 32).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass eine Inkubation der Platte von 60 min im Inkubator mit anschließenden 30 min bei RT die Dosis-Wirkungskurve im Koordinatensystem weiter nach links verschiebt ( $EC_{50} = 2,86$  ng/ml, vgl. Abb. 28) als es bei 60 min RT ( $EC_{50} = 8,17$  ng/ml, vgl. Abb. 28) der Fall ist. Jedoch erreicht die Kurve bei RT einen ähnlichen Verlauf, sodass diese Möglichkeit aufgrund der unkomplizierteren Durchführung und des Nicht-Angewiesenseins auf einen Inkubator durchaus als Alternative anzusehen ist. Gegensätzlich verhält sich der Kurvenverlauf bei Ausdehnung der Inkubationszeit: Nach 90 min RT ist im Gegensatz zu 60 min RT ein klarer RLU-Abfall zu beobachten, während im Zeitrahmen von 0 - 30 min nach 60 min Inkubation im Inkubator ein Anstieg bemerkt werden kann. Entscheidet man sich für die Inkubation bei RT, sollte aufgrund des SRR%-Anstiegs eine Zeit von 90 min gewählt werden; im Falle des Inkubators sollten den 60 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unbedingt 30 min bei RT folgen. Unabhängig von der Auslegung der Protokollmodifikationen ist zusätzlich bemerkenswert, dass schon Schritte von 0,0125 auf 0,025 ng/ml M22 in NS durch Steigerung der RLU-Werte vom Assay detektiert werden (vgl. Abb. 28 und 29), was für eine hohe Sensitivität spricht, und erinnert damit an die eingangs erwähnte Dosis-Wirkungskurve des Thyretain® TSI Bioassays aus der Arbeit von Diana, Olivo *et al.* aus dem Jahr 2019.

Bei Betrachtung der Mischung von M22- und K1-70-Konzentrationen ist darauf aufmerksam zu machen, dass die Versuche noch nach ON-Wachstum und einstündiger Inkubationszeit durchgeführt wurden. Dennoch spricht es schon in diesem frühen Entwicklungsstadium für den Assay, dass mit absteigender K1-70-Konzentration bei fixierter M22-Konzentration im Verlauf der x-Achse höhere RLU-Werte gemessen werden konnten (vgl. Abb. 16 - 19). Des Weiteren fielen die RLU-

Werte mit absteigender M22-Konzentration wie erwartet, was bereits an den sich stets verringernden Höchstwerten der y-Achsen-Skala in den genannten Abbildungen abgeschätzt werden kann. Eine weitere Erkenntnis erlaubt die unmittelbare Gegenüberstellung der Messzeiten in den Säulendiagrammen: RLU-Höchstwerte wurden in nahezu jedem Fall nach Messzeiten von 30 bzw. 40 min erreicht. Positive % Inhibition wurde in Konzentrationen von 3 - 500 ng/ml K1-70 bei einer fixierten M22-Konzentration von 6 ng/ml erreicht, während dies erst ab 15 ng/ml K1-70 bei einer fixierten M22-Konzentration von 12 ng/ml der Fall war. Insofern hemmten die K1-70-Konzentrationen von 3 und 7 ng/ml die stimulierende Aktivität des M22 in einer Konzentration von 12 ng/ml nicht oder nur in geringem Umfang (vgl. Abb. 21).

Frühere Arbeiten zeigten nicht nur, dass K1-70 durch seine hohe Affinität zum TSH-R in der Lage ist, TSH und stimulierende polyklonale Antikörper in Patientenseren (Evans, Sanders et al. 2010) und im Tierversuch (Furmaniak, Sanders et al. 2012) zu inhibieren, sondern testeten auch seine Interaktion mit stimulierenden monoklonalen Antikörpern wie M22 (Evans, Sanders et al. 2010, Diana, Wuster et al. 2017). In letztgenannter Publikation wurden ähnlich wie in vorliegender Arbeit Mischungen der beiden monoklonalen Antikörper auf SRR% im Thyretain® TSI Bioassay und auf % Inhibition im Thyretain® TBI Bioassay getestet. Obwohl ein Vergleich mit Immunoassays im Vordergrund der Arbeit steht, lässt sich anhand der präsentierten Säulendiagramme erkennen, wie konstant der SRR%-Zuwachs mit abnehmendem Anteil von K1-70 in den Konzentrationen im TSI Bioassay vor sich geht. Im TBI Bioassay wird ab einem Anteil von 40 % K1-70 eine negative % Inhibition erreicht, was gleichbedeutend ist mit stimulierender Aktivität in diesem Verhältnis. Im vorliegenden GS Assay tritt ab 7 ng/ml K1-70 bei einer fixen M22-Konzentration von 12 ng/ml eine negative % Inhibition auf (vgl. Abb. 21), was einem Anteil von circa 36,8 % K1-70 entspricht. Auch wenn das TBI Bioassay nicht direkt mit dem TSI GS Assay verglichen werden kann, zeichnete sich insgesamt mit sinkendem K1-70 Anteil ein ähnlicher Verlauf ab, wie anhand der RLU-Werte aus Abb. 20 abgeschätzt werden kann. Interessant ist jedoch, dass sich beim Vergleich von 7 ng/ml K1-70 (36,8 % K1-70 : 63,2 % M22) und 3 ng/ml K1-70 (20 % K1-70 : 80 % M22) keine weitere Erhöhung der Lichtsignale durch vermehrte Stimulation im GS Assay nachweisen lässt, während dies im TSI Bioassay, wie von Diana, Wuster *et al.* anhand von SRR%-Werten gezeigt, definitiv der Fall ist.

## 5.2 Stimulation mit Patientenseren und euthyreoten Kontrollen

### 5.2.1 Diskussion der Versuchsergebnisse

Um schon in einem frühen Stadium der Versuchsreihen zu determinieren, ob eine Verdünnung wie im Thyretain® TSI Bioassay (1:11) für den GS Assay notwendig sein würde, wurde zunächst eine im TSI Bioassay hochpositive Patientenprobe (714 SRR%) eines an MB erkrankten Patienten bis zu einem Verhältnis von 1:2816 verdünnt. Über alle Messzeiten hinweg zeigte sich, dass die RLU-Werte sich bereits ab einer Verdünnung von 1:11 gegenüber der unverdünnt aufgetragenen Probe deutlich verringerten (vgl. Abb. 34 und 35). Parallel dazu wurde die Verdünnungsreihe im Thyretain® TSI Bioassay gemessen, wobei das Protokoll entsprechend der grundlegenden Versuche von Lytton, Li *et al.* eine Verdünnung von 1:11 vorsieht (Lytton, Li *et al.* 2010). Anhand Abb. 36 lässt sich erkennen, dass das TSI Bioassay eine weniger steile Verdünnungskurve an SRR%-Werten für diese Probe ergibt, was wiederum für eine bessere Differenzierbarkeit spricht. Allerdings stellen sich diese Ergebnisse für die Durchführung des neuen Assays als sehr vorteilhaft heraus: Die Praktikabilität des Assays steigt durch den wegfallenden Verdünnungsschritt und hebt sich in diesem Punkt von weiteren neueren cAMP-Assays ab (Araki, Iida *et al.* 2015, Diana, Olivo *et al.* 2019). Insofern, begründet durch den sofortigen Abfall der RLU-Werte nach Verdünnung, wurden für die folgenden Versuche ausschließlich unverdünnte Proben verwandt. Abgesehen von diesem Punkt weisen die Dosis-Wirkungskurven der beiden Assays eine hohe Vergleichbarkeit auf.

Um der Frage nach der Volumenmenge nachzugehen, mit der die zu diesem Zeitpunkt noch angewachsenen Zellen inkubiert werden sollten, wurden sowohl eine moderat als auch eine hochpositive Patientenprobe herangezogen, die in den Volumina 1, 2,5, 5, 10, 20, 30 und 40 µl aufgetragen wurden. Bei beiden Patientenproben ergab eine Menge von 10 µl die höchsten RLU-Werte, da es bereits ab 20 µl wieder zu einem Werteabfall kam (vgl. Abb. 37 und 39), sodass davon auszugehen ist, dass ein Ungleichgewicht zwischen Antigen- (TSH-R) und Antikörperzahl der polyklonalen Antikörper in den Patientenseren besteht. Im Vergleich zum Thyretain® TSI Bioassay sowie auch zu anderen cAMP-Assays (Araki, Iida *et al.* 2015, Diana, Olivo *et al.* 2019), in denen 30 bzw. 25 µl Serum pro Well benötigt wird, stellt der GS Assay diesbezüglich eine Einsparung von Patientenmaterial dar. Allerdings muss erwähnt werden, dass die

Überlegenheit von 10 µl gegenüber 5 µl nicht zwangsläufig für jede getestete Patientenprobe gilt; so erreichte der Assay in einer weiteren hochpositiven Probe für 5 µl höhere RLU-Werte (vgl. Abb. 41). Auch für weitere moderat und niedrig positiv getestete Proben kann kein eindeutiger Nutzen des höheren 10 µl-Volumens belegt werden, sodass davon auszugehen ist, dass kein Qualitätsnachteil bei Verwendung eines noch materialsparsameren Volumens entsteht, wie die Ergebnisse der Standardisierung und der Spezifitäts- und Sensitivitätstestung, die nach Versuchsansatz IX mit 5 µl erreicht wurden, im späteren Verlauf zeigen sollten. Ein Nutzen von höherem Volumen wird durch die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.2 allerdings nicht angenommen.

Für die klinische Verwendung des Assays ist selbstverständlich die klare Differenzierung zwischen Seren von gesunden und an MB erkrankten Patienten und innerhalb letzterer die Differenzierung von niedrig, moderat und hochpositiven Seren von entscheidender Bedeutung. Anhand des Vergleichs der identischen Proben bei unterschiedlicher Zellwachstumszeit (ON, 2 h, 3 h) kann nun die Fähigkeit des Assays zur Abstufung der nach Tab. 7 durchgeführten Klassifikation der Proben im Thyretain® TSI Bioassay geprüft werden, gemeinsam mit der Frage, welche Zellwachstumszeit die günstigsten Ergebnisse im Assay erbringt.

Zunächst ist erst einmal die Unterscheidung von euthyreotem NS zu niedrig positiven Proben relevant. In Abb. 43 kann gesehen werden, dass die RLU-Werte der im TSI Bioassay unter 140 SRR% gemessenen NS einen Wert von 10.000 RLU nur in Einzelfällen überschreiten; vielmehr liegt der Mittelwert aller getesteten NS nach 10 min bei knapp 2.500, nach 30 min bei knapp 8.500 und nach 50 min bei knapp 8000 RLU. Davon heben sich die niedrig positiven Seren abgesehen von Probe „Niedrig (+) 6“ deutlich ab und erreichen beispielsweise nach 30 min Werte, die im Mittel 2,5fach so hoch wie der Mittelwert der NS nach 30 min Messzeit sind. Dazu trägt allerdings auch Probe „Niedrig (+) 1“ bei, die RLU-Werte von über 50.000 erreicht, was selbst bei moderat positiven Proben nicht immer der Fall ist (vgl. Abb. 43 und 45). Ebenso hätten mit den vorliegenden Werten die Proben „Moderat (+) 2“ und „Moderat (+) 6“ als niedrig positiv eingestuft werden können. Anders dagegen verhält es sich im unmittelbaren Vergleich der RLU-Werte mit hochpositiven Proben: Der Ansprung der Werte von im Mittel circa 38.000 RLU der moderat positiven Proben auf circa 62.000 RLU der hochpositiven Proben nach 30 min Messzeit sprechen für die Sensitivität des Assays, auch wenn einzelne Proben sich im Assay nicht wie erwartet verhalten (vgl. Abb. 45:

Probe „Moderat (+) 4“). Grundsätzlich ist dank dieser Ergebnisse bei ON-Inkubation also als erster Punkt festzuhalten, dass die Unterscheidung zwischen positiv und negativ im Gesamten funktioniert. Die Differenzierung in niedrig, moderat und hochpositiv lässt sich auf statistischer Ebene ebenfalls bestätigen, da, wie anhand der RLU-Mittelwerte erläutert, ein Trend zur RLU-Zunahme von Gruppe zu Gruppe deutlich erkennbar ist. Jedoch ist als zweiter Punkt zu bemerken, dass einzelne Proben aus dem Rahmen fallen („Niedrig (+) 1“, „Niedrig (+) 6“, „Moderat (+) 2“, „Moderat (+) 4“, „Moderat (+) 6“). Tatsächlich setzt sich dieses Muster in der Probenverteilung auch bei verkürzten Zellwachstumszeiten fort (ab Abb. 48), denn durch die Reduktion auf 2 h bzw. 3 h komprimieren sich zwar die RLU-Werte, das Verhältnis der Werte untereinander bleibt jedoch im Großen und Ganzen bestehen (Abb. 52), obwohl innerhalb dieser kurzen Zeit kein konfluenter Zellrasen entstehen konnte (Abb. 47). Diese Erkenntnis gibt Anlass, das ON-Wachstum der Zellen zu verlassen und sie stattdessen in praktikablerer Weise nur über 2 h wachsen zu lassen. Diese kurze Zellwachstumszeit stellt gegenüber den in der Literatordiskussion vorgestellten Bioassays eine Neuerung dar: Während die FRTL-5-Zelllinie aus Schilddrüsenzellen der Ratte noch aufwendig über Tage kultiviert und passagiert werden musste, bevor der Assay durchgeführt werden konnte, verkürzten sich in der weiteren Historie die Wachstumszeiten bei den JP-Zellen zunächst auf 48 h, wobei aber auch streng auf adäquate Bedingungen sowie Erneuerung des Kulturmediums geachtet werden musste (Ambesi-Impimbato, Parks et al. 1980, Ludgate, Perret et al. 1990). Erst mit Verwendung der CHO K1-Zelllinie konnte man die Zellwachstumszeit auf weniger als einen Tag reduzieren, wobei dennoch die ON-Inkubation der am Vorabend in die Platten ausgesäten Zellen verpflichtend blieb (Lytton, Ponto et al. 2010) und sich auch in der direkten cAMP-Messung durchsetzte (Frank, Braeth et al. 2015, Diana, Olivo et al. 2019). Einzig der Assay, der TSI mithilfe des Aequorin-Werts detektiert, benötigt eine Zellwachstumszeit von nur 4 h (Araki, Iida et al. 2015). Vor diesem Hintergrund ist dieser Entwicklung im GS Assay besondere Beachtung zu schenken.

Aus dem vergleichenden Säulendiagramm in Abb. 52 lässt sich zudem lesen, dass die hochpositiven Proben sich insofern von den anderen Gruppen abheben, als dass ihr RLU-Mittelwert beispielsweise nach 30 min Messzeit nach 2 h Wachstumszeit noch 68,68 % des ON-Wertes zeigte, während es bei den moderat positiven Proben zum gleichen Messzeitpunkt 41,71 % waren und damit weniger als die Hälfte. Daher ist bei

der reduzierten Wachstumszeit von 2 h zu beachten, dass hochpositive Proben sich stets deutlicher von den anderen getesteten Gruppen abheben werden und diese enger zusammenliegende Lichtresultate präsentieren werden. Aus diesem Grund, um Unterscheidbarkeit sowie Reproduzierbarkeit nach 2 h zu testen, wurden je eine Probe NS, niedrig und moderat positives Serum in 18 Replikaten getestet (vgl. Tab. 23 - 28).

Zunächst konnten bereits oben beschriebene Ergebnisse bestätigt werden, denn auch in dieser Versuchsreihe wurden nach 30 min Messzeit die höchsten RLU-Werte erzielt. Durchschnittlich erreichte die niedrig positive Probe einen 3,3fachen RLU-Wert gegenüber dem NS und die moderat positive Probe wiederum einen 2,6fachen RLU-Wert gegenüber der niedrig positiven Probe, gemittelt über alle Messzeiten. Zwar wurde je nur eine Probe aus jeder Gruppe betrachtet; dennoch kann man in diesem Fall von einer klaren Abgrenzung sprechen. Ziel war es zudem gewesen, den Variationskoeffizienten als ein Streuungsmaß der Replikate äquivalent zum Thyretain® TSI Bioassay auf kleiner gleich 15 % zu beschränken (Leschik, Diana et al. 2013). Am höchsten zeigte sich der Koeffizient bei der Probe NS (Mittelwert über alle Messzeiten: 16,35 %), gefolgt von der moderat positiven Probe (11,57 %), und am niedrigsten bei der niedrig positiven Probe (10,4 %). Insofern ist das Ziel größtenteils erreicht worden, zumal der Variationskoeffizient mit höherer Messzeit ansteigt, jedoch für ein Zellwachstum von 2 h eine Messzeit von 30 min am günstigsten ist. Eine annehmbare Reproduzierbarkeit des Assays insbesondere für Patientenproben ist somit gegeben und wird durch die hohe Anzahl von 18 Replikaten unterstrichen.

Nachdem sich diese Reproduzierbarkeit bestätigt hatte, wurden weitere Parameter im Protokoll des Assays modifiziert: Die neue GS Referenzkontrolle, die in NS gelöst zur Berechnung der SRR%-Werte ab Kapitel 4.2.6 verwandt wurde, ermöglicht SRR%-Werte in einem übersichtlicheren Bereich (ab Abb. 55), während die zuvor verwandte Referenzkontrolle Werte in den Tausendern (vgl. Abb. 44 und 46) erbrachte. Neben der Variation der Inkubationszeiten, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, wurde im Sinne einer gesteigerten Praktikabilität und einer geringeren Durchführungszeit die zuvor evaluierte Zellwachstumszeit von 2 h für einen gänzlichen Wegfall der Wachstumszeit verlassen, indem die Zellen direkt im 6%-igen GS cAMP Reagenz gelöst wurden. Ein direkter Vergleich aller Zellwachstumszeiten (ON, 3 h, 2 h, direkt in Reagenz gelöst) ist möglich mit dem Wissen, dass die in Abb. 53 und 54 dargestellten Proben den Serumproben „Niedrig (+) 5“, „Moderat (+) 3“ und „Hoch (+) 5“ aus den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 entsprechen, wobei die Ergebnisse einer



Inkubationszeit von 1 h im Inkubator betrachtet werden müssen, um den direkten Vergleich zu gewährleisten (Abb. 53): Die RLU-Werte reduzierten sich ohne Wachstumszeit stark, wie ohne Zellmonolayer zu erwarten gewesen ist, insbesondere bei der hoch positiven Probe. Eine Differenzierung zwischen niedrig positiver und moderat positiver Probe, welche sich schon bei Zellwachstumszeiten von 2 und 3 h schwierig gestaltet hatte, konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Stattdessen wurde aber auch unter diesen Bedingungen die Fähigkeit des Assays bewiesen, die Patientenseren von negativen, euthyreoten Kontrollen abzuheben, da Abb. 55 eine Verdopplung der SRR%-Werte im Vergleich von NS und niedrig positiven Patientenseren zeigt. Genauso ist die Fähigkeit erhalten geblieben, hoch positive Seren von den anderen Gruppen abzuheben.

Ein ebenso bedeutender Parameter scheinen die Inkubationsbedingungen sowie die Inkubationszeit zu sein, wie die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.6 zeigen. Zunächst ist die ursprüngliche Inkubation über 1 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> einer längeren Periode von 2 h gegenübergestellt (Abb. 53 - 56). Es zeigte sich, dass die RLU-Werte bei der zweistündigen gegenüber der einstündigen Inkubation in allen getesteten Gruppen an Höhe verloren und besonders die Unterscheidbarkeit von moderat und hochpositiven Seren darunter litt (Abb. 54). Unter der Fragestellung, ob ein Inkubator überhaupt für die Durchführung des Assays vonnöten ist, wurde der 2. Versuch unternommen, indem eine Inkubation bei 60 min RT einer 60-minütigen Inkubation im Inkubator mit anschließenden 30 min bei RT gegenübergestellt wurde. Auch wenn die Unterschiede in den RLU-Werten (Abb. 57) zwischen beiden Modellen durch die SRR%-Werte etwas relativiert werden (Abb. 58), scheint die höhere Temperatur, die im Inkubator herrscht, für ein höheres Lichtsignal zu sorgen. Allerdings nur, wenn im Anschluss eine Zeit bei RT erfolgt: Nach 60 min im Inkubator und 0 min bei RT lässt sich kaum ein Lichtsignal detektieren (Abb. 61), wie auch bei Diskussion der M22-Dosis-Wirkungskurven festgestellt wurde (vgl. Kapitel 5.1). Umgekehrt dagegen verhält es sich bei Ausdehnung der Inkubationszeit bei RT: Nach 90 min nehmen die RLU-Werte der Patientenproben deutlich ab im Vergleich zu 60 min (Abb. 59). Doch dies gilt nicht für die SRR%-Werte: Bei einer Vielzahl an Patientenproben aus allen Gruppen nahmen diese über die Zeit zu (vgl. Abb. 63 und 64), was sich für die Differenzierung als günstig erweist und die Rechtfertigung für eine Bevorzugung der 90 min bei RT darstellt. Insofern zeigen monoklonale Antikörper und Patientenseren das gleiche Verhalten bei Variation der Inkubationsbedingungen.

Eine zusätzliche Beobachtung, die im Vergleich zwischen dem ersten und dem zweiten Versuch in Kapitel 4.2.6 gemacht werden kann, ist der starke RLU-Anstieg beim Wechsel von schwarzen 96-well-Platten mit durchsichtigem Boden (vgl. Abb. 53 und 54) auf weiße 96-well-Platten mit durchsichtigem Boden (vgl. Abb. 57), was als vorteilhaft für die Assay-Entwicklung anzusehen ist.

Auf mehreren Ebenen ist der in Abb. 67 und Tab. 29 gezeigte Vergleich mit einem weiteren Labor (Diagnostic Hybrids, Inc., DHI) interessant.

Zum Ersten bietet er die Möglichkeit, die zuvor ausgeführten Überlegungen bezüglich der Inkubationszeiten zu untermauern: 90 min bei RT sind 60 min im Inkubator plus 30 min bei RT gegenübergestellt. Tatsächlich zeigt sich im direkten, unmittelbaren Vergleich, dass die reine RT-Inkubation nur minimal und auch nicht in jedem Fall unterlegen ist, eine Ausnahme bildet zum Beispiel die Probe H5; in vielen Fällen können die Werte als äquivalent betrachtet werden. Eine Inkubation bei RT hätte im klinischen Routinegebrauch den Vorteil, dass auch kleinere Labore nicht zur Anschaffung eines Inkubators genötigt wären und würde das Protokoll des Assays vereinfachen.

Zum Zweiten eignet sich die dargestellte Weise als Fold Increase optimal, um die gemessenen Serumproben gegenüber den NS zu betrachten. Schließlich ist es Ziel jedes diagnostischen Tests, durch eine hohe Sensitivität die Patienten gegenüber den Gesunden als positiv zu klassifizieren. Da, wie aus Tab. 29 ersichtlich, schon bei niedrig positiven Proben Werte von bis zu 4,4 im GS Assay erreicht werden können, spricht auch diese Versuchsreihe genau wie die zuvor diskutierten Säulendiagramme in RLU für eine gute Unterscheidbarkeit von negativen und positiven Proben.

Zum Dritten sollen auch die ebenfalls im Thyretain® TSI Bioassay gemessenen Werte der verwandten Seren Erwähnung finden. Für eine Korrelation der Werte der beiden Assays spricht der Anstieg der Thyretain®-Werte; durchschnittlich lag der Fold Increase beider Labore bei den niedrig positiven Proben bei 3,2, bei den moderat positiven Proben bei 5,53 und bei den hoch positiven Proben bei 8,4. Somit folgen die GS Assay Werte dem etablierten Thyretain®-Assay, auch wenn der Anstieg der hochpositiven Seren im GS Assay unverhältnismäßig im Vergleich zu den anderen Gruppen erscheint. Wie die Mittelwerte des Thyretain®-Assay zeigen, ergeben sich konstante, regelmäßige Abstufungen zwischen den Gruppen, die Fold-Increase-Werte der hochpositiven Proben im GS Assay jedoch überschreiten bei Weitem sogar die

Skala der y-Achse. Hier kann man Differenzen zwischen den Assays erkennen, welche weiterer Untersuchungen bedürfen; die grundsätzliche Vergleichbarkeit jedoch ist gegeben.

Zum Vierten und Letzten trägt natürlich auch dieser internationale Vergleich zwischen zwei nach den gleichen Methoden und mit den identischen Seren arbeitenden Laboren zum Beweis der Reproduzierbarkeit des Assays bei. Bei 8 der 38 Vergleichspaare (19 Mal 90 min RT, 19 Mal 60 min 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> + 30 min RT) zeigten die Ergebnisse von DHI einen höheren Fold Increase-Wert, während in einem Großteil der Fälle die Werte in unserem Labor höher gemessen wurden. Dennoch zeigen die Diagramme, die die Vergleichswerte direkt nebeneinander abbilden, im Allgemeinen eine hohe Ähnlichkeit. Doch es gibt Ausnahmen: Während bei den niedrig positiven Proben 1,8 die größte Differenz zwischen zwei Wertepaaren darstellt, sind es bei den moderat positiven Proben schon 6,4 und bei den hoch positiven Proben maximal 124,3. Alle diese großen Differenzen (insbesondere M5, H1, H4, H5) wurden bei Inkubationsbedingungen im Inkubator + RT festgestellt, doch auch der Vergleich bei RT zeigt bei den hoch positiven Proben eine deutliche Abweichung zwischen den Laboren. Insgesamt steigt also die Abweichung mit erhöhter TSI-Konzentration in den Seren.

### **5.2.2 Besonderheiten der Testung mit Patientenseren**

Dies soll zum Anlass genommen werden, die Merkmale aufzuzeigen, die im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern bei der Arbeit mit Patientenseren zu beachten sind. Nicht ohne Grund erfolgten viele der Bioassay-Entwicklungen via Stimulation mit aufgereinigten IgG-Antikörpern und nicht direkt mit dem reinen Serum. Bereits als die Assays zur Detektion von TSI noch mit Schilddrüsengewebe durchgeführt wurden, war die Gewinnung von reinen Immunglobulinen der erste Schritt (Kasagi, Konishi et al. 1982, Rapoport, Filetti et al. 1982). Dies war auch noch der Fall, als sich Zellkulturen mit CHO Zellen bereits durchgesetzt hatten, wie etwa der Assay-Vergleich von Vitti, Elisei *et al.* zeigt (Vitti, Elisei et al. 1993), obwohl es stets Versuche gegeben hatte, diesen aufwendigen Schritt zu umgehen (Vitti, Chiovato et al. 1988). In letztgenannter Arbeit, die sich mit der FRTL-5-Zelllinie beschäftigte, konnten mit reinem Serum im Vergleich zu den aufgereinigten IgGs etwa nur die Hälfte der Seren als TSI-positiv erkannt werden. Ähnlich erging es Botero und Brown mit pädiatrischen Patientenproben (Botero and Brown 1998). Bessere Ergebnisse zeigte dagegen der

Assay im Vergleich von aufgereinigten IgGs und unfraktioniertem Serum von Morgenthaler, Pampel *et al.* bereits unter Verwendung von JP-Zellen (Morgenthaler, Pampel *et al.* 1998) sowie die Arbeit von Watson, Ajjan *et al.* (Watson, Ajjan *et al.* 1998), was Anlass zur Hoffnung einer Vereinfachung im Assay-Ablauf gab. Letztendlich haben die zahlreichen Arbeiten zum etablierten Thyretain® TSI Bioassay gezeigt, dass reproduzierbare Ergebnisse auch ohne eine vorherige Aufreinigung durchaus erreichbar sind. Dennoch liegt die Annahme nahe, dass das humane, unbehandelte Serummaterial Störfaktoren enthält, die die Messung der Antikörper erschweren könnten und die konstanteren Ergebnisse bei der Testung von beispielweise M22-Konzentrationen erklären, wie sie auch in dieser Arbeit an einigen Stellen zu beobachten ist: Während der GS Assay ähnlich wie der Thyretain® TSI Bioassay die gewünschte sigmoidale M22-Dosis-Wirkungskurve zuverlässig reproduzieren kann, ist die Einheitlichkeit bei Patientenproben nicht immer gegeben. Nicht alle Patientenproben einer Gruppe, beispielsweise moderat positive Seren, verhalten sich im Assay gleich, obwohl eigentlich eine ähnliche Antikörperkonzentration vorliegen sollte, wie Kapitel 4.2.3 anschaulich zeigt. Hier gibt es moderat positive Proben, die im GS Assay als niedrig positiv oder in anderen Fällen als hoch positiv klassifiziert werden könnten. Auch wenn sich dieses Phänomen bei den präsentierten Ergebnissen in Grenzen hält, muss doch nach Gründen gesucht werden. Obwohl die stimulierenden Antikörper der treibende Faktor in der Entwicklung des MB sind, wurde gezeigt, dass neben des cAMP-Signalwegs via CREB eine Vielzahl an weiteren Signalkaskaden eine Rolle am TSH-R spielen (Morshed and Davies 2015), unter anderem wird auch den vermeintlich neutralen TSH-R-Antikörpern eine nicht unwesentliche Rolle zugeschrieben, die mit Apoptose in Verbindung gebracht wird. So könnte man spekulieren, da diese Prozesse durch den cAMP-Assay nicht quantifiziert werden, dass die Anzahl dieser weiteren Antikörper in den verschieden getesteten Seren unterschiedlich hoch ist und so zu einer Verfälschung des Assay-Ergebnisses führen. Überdies sind die Bindungseigenschaften der verschiedenen Antikörpertypen noch nicht vollständig geklärt: Zwar hatten Tahara, Ban *et al.* durch ihre Studie mit Chimären des TSH-R die Epitope für TSI und TBI schon sehr genau definiert (Tahara, Ban *et al.* 1991), doch die Hinweise für eine gemeinsame Bindungsregion sind mehrfach publiziert worden (Tahara, Ishikawa *et al.* 1997, Latif, Teixeira *et al.* 2012). All diese noch nicht in ihrer Gänze erfassten Prozesse könnten dazu beitragen, die im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern vermehrt auftretenden Individualitäten der polyklonalen Antikörper zu erklären. Dennoch muss betont werden,

dass es bei Messung der Patientenserum zu keinem Verlust der Lichtsignale gekommen ist; ganz im Gegenteil, die Höhe der RLU-Werte korreliert sehr gut mit den M22-Konzentrationen und spricht für eine geringe Anfälligkeit des Assays gegenüber obigen potenziellen Störfaktoren. Aufgrund dieser Erkenntnis konnte eine Standardisierung mit dem internationalen WHO-Standard 08/204 sowie weiteren M22-Standards vorgenommen werden.

### **5.3 Internationale Standardisierung mittels WHO-Kalibrator (08/204)**

Die Standardisierung, sprich die Umrechnung der Ergebnisse des Assays (in diesem Fall RLU) in eine standardisierte Einheit wie internationale Einheiten pro Liter (IU/L) anhand eines etablierten Standards, bringt das Privileg mit sich, Messwerte verschiedener Platten besser miteinander vergleichen zu können. Zudem bietet die höhere Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit den Vorteil, Patientenwerte beispielsweise im Krankheitsverlauf besser verfolgen und evaluieren und so eine Veränderung der Antikörperkonzentration im Serum auf einer verlässlichen Basis klinisch interpretieren zu können. Literatur zu bisher erfolgten Standardisierungen von zellbasierten TSI-Bioassays beschränkt sich auf die Arbeit von Diana, Kanitz *et al.* für das Thyretain® TSI Bioassay (Diana, Kanitz *et al.* 2015).

Die Messung der Konzentrationen von 0,0156 bis 15 IU/L des zweiten Internationalen Standards der WHO (08/204), der auf dem monoklonalen stimulierenden Antikörper M22 basiert, wurde in drei Panels in NS-Pools verdünnt und in einem Panel in PBS. Die daraus entstandenen Kalibrationskurven der 28 Platten sind in Abb. 68 zu sehen, wobei die Kurven der Platten 3, 6, 9, 14, 17 und 24 die Verdünnungen in PBS zeigen. Alle Kalibrationskurven nahmen, mit Angabe des RLU-Verhältnisses auf der y-Achse, einen sigmoidalen Verlauf, sodass auch hier, wie bereits bei der Testung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern der Fall, die Lichtsignale konzentrationsabhängig zunahmen. Bei den Kalibrationskurven der in den NS verdünnten IS-Konzentrationen entsprach die gleichzeitig gemessene hochpositive Kontrolle einer höheren Konzentration des IS-Standards, als dies bei den PBS-Kurven (Panel D) der Fall ist, sodass sich bei Verdünnung mit NS ein größerer Bereich zur Differenzierung ergab. Eine gute Reproduzierbarkeit der Werte auch im Inter-Panel-Vergleich wird von Abb. 69 abgebildet, während die Werte der in PBS gelösten Konzentrationen zwar dem Trend folgten, aber eine höhere Abweichung aufwiesen;

außerdem stieg die Streuung der Werte mit einer höheren Konzentrationen des Standards. Diese Beobachtung wird auch von Abb. 70 unterstützt, die die acht M22-Standards zeigt, die mit einer Spannweite von 0,01 - 12,1 IU/L dem linearen Bereich der Kalibrationskurven entsprechen. Anhand der eingangs erläuterten Kalibrationskurven erwies sich auch die Berechnung der IU/L für die ebenfalls auf den Platten gemessenen Kontrollen als interessant (vgl. Abb. 71): Die Negativkontrolle und der Blank (Blk, entspricht RB) zeigten kaum eine Reaktion. Ähnlich verhielt es sich mit der niedrigstpositiven Kontrolle (ULP), die minimal erhöhte IU/L-Werte zeigte. Für die hochpositive Kontrolle (HP) konnten deutlich höhere Konzentrationen errechnet werden, doch die Abweichung innerhalb und zwischen den Panels war auch dementsprechend höher. In einem anschließenden Schritt wurden die insgesamt 24 negativen und 24 positiven Proben geordnet nach Serumpanel anhand ihrer jeweiligen Kalibrationskurve in IU/L umgerechnet (Abb. 72), wobei die Replikate jeder Platte berücksichtigt wurden. Beispielhaft soll Serumpanel 1 genauer betrachtet werden: Zwar hatten die errechneten Konzentrationen der Negativkontrollen Neg1 - Neg8 eine große Spannbreite (vgl. insbesondere Neg2 und Neg6), doch die Mittelwerte aller Negativproben sind für Panel A 0,017 IU/L, für Panel B 0,062 IU/L und für Panel D 0,034 IU/L, Panel C wurde von der Beobachtung ausgeschlossen, da von Serumpanel 1 nur eine Platte mit dem WHO-Standard C gemessen wurde. Für die positiven Proben Pos1 - Pos8 konnten im Mittel in Panel A 1,329 IU/L, in Panel B 1,547 IU/L und in Panel D 1,570 IU/L erreicht werden. Damit lagen diese Werte in der Nähe der Messwerte, die zuvor für die hochpositive Kontrolle (HP) festgestellt wurden, und hoben sich von den Negativproben ab; noch deutlicher ist diese Unterscheidung in Serumpanel 2 zu erkennen (vgl. Abb. 72). Gleichzeitig zeigte die Breite der in dieser Abbildung dargestellten Boxplots aber auch die Streuung der Werte, die bei den Negativkontrollen höher zu sein schien als bei den Positivkontrollen. Doch auch wenn es, wie durch die einzelnen Punkte abgebildet, „Ausreißer“-Werte innerhalb eines Panels gab (bspw. Neg15, Neg23, Pos7), lässt eine Ähnlichkeit im Panel-Vergleich A bis D insgesamt auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich der Großteil der Negativkontrollen im unteren Drittel der Kalibrationskurve befand, während die Positivkontrollen im Zentrum der Kurve nahe des Wendepunkts angesiedelt waren. Selten wurde eine Konzentration errechnet, die über den zur Standardisierung verwandten Bereich hinausging, so zum Beispiel ein Replikat der Probe Pos3 in Serumpanel 1 mit einer errechneten Konzentration von 17,142 IU/L. Häufiger war dagegen die Errechnung von Konzentrationen bei

Negativproben im unteren Bereich, die nicht von der Kalibrationskurve abgedeckt wurden.

In äquivalenter Weise wurde mit den Konzentrationen der acht ausgewählten Standards aus Tab. 20 verfahren (0,01 - 12,1 IU/L), um diese Auswahl des linearen Bereichs auf ihre Gleichwertigkeit mit einer höheren Anzahl an Konzentrationen zur Kalibration zu prüfen. Gleichermaßen wurde für jede Platte eine eigene Kalibrationskurve erstellt (Abb. 73) und ebenfalls die errechnete Konzentration der hochpositiven Kontrolle eingetragen. Die Ergebnisse für Panel D unterschieden sich in diesem Fall nicht von den anderen Panels, da die Verdünnung in PBS nur für den WHO IS unternommen wurde. Während die Ergebnisse aus den Abb. 74 und 75 jenen aus der WHO-Standardisierung ähnelten (vgl. Abb. 69 und 70), zeigte sich die hochpositive Kontrolle (HP) bei Errechnung der Werte mit den M22-Standards deutlich homogener und erzielte höhere IU/L-Werte (Abb. 76). In Bezug auf die Daten der je 24 negativen und positiven Patientenproben zeigte sich ein ähnliches Verhältnis von Negativ- zu Positivproben. Hochpositive Proben wie Pos3, Pos9, Pos13 und Pos17 stachen auch hier ins Auge.

In der Weiterentwicklung des Assays in Bezug auf das Standardisierungsprozedere sollte versucht werden, den linearen Bereich der Kalibrationskurve insofern zu erweitern, dass eine deutliche Klassifizierung der Patientengruppen vorgenommen werden kann. Es könnte in Betracht gezogen werden, Seren mit einem sehr starken Lichtsignal (bspw. Pos3) entsprechend zu verdünnen, um eine gute Vergleichbarkeit mit negativen Seren, die kaum eine Antwort im Luminometer geben (bspw. Neg6), zu schaffen.

### **5.4 Testung von Sensitivität und Spezifität**

Da in der Studie zur Standardisierung und auch in jener zur Sensitivität und Spezifität erstmals die vollständige Anzahl der 96 Wells ausgenutzt wurde, konnten auf 17 Platten 226 und 176 Immulite®-positive Seren in Triplikaten gemessen werden. Nachdem sich die Kalibration mit den acht M22-Standards des linearen Bereichs als funktionabel erwiesen hatte (vgl. Kapitel 5.3), wurde für jede der 17 Platten eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 79). Die errechneten Konzentrationen der negativen und positiven Seren in IU/L der einzelnen Replikate (Abb. 80) beziehungsweise der Mittelwerte zweier Duplikate (Abb. 81) und aller Triplikate (Abb. 82) sind unter Markierung eines festgesetzten Cut-Offs von 0,08 IU/L dargestellt. In den zugehörigen

Vier-Felder-Tafeln lässt sich ablesen, wie sensitiv und spezifisch sich die Replikate im Assay nach Umrechnung in IU/L verhielten. Replikat 1 zeigte unter den singulären Replikaten die höchsten Werte für Sensitivität (98,7 %) und Spezifität (93,8 %), unter den Duplikaten war es der Mittelwert aus Replikat 1 und 2 (97,8 %, 93,2 %). Der Mittelwert der Triplikate ergab ähnliche Ergebnisse (97,0 %, 92,6 %).

Ziel dieser Testungen war es unter anderem gewesen, zu beurteilen, wie gut der Assay mit einer eingeschränkten Anzahl von Replikaten funktioniert, ob es denkbar wäre, die Anzahl der Replikate auf eins zu reduzieren. Dies würde sowohl die Effizienz erhöhen als auch die Materialkosten senken, da die doppelte bzw. dreifache Menge an Patientenseren gemessen werden könnte. Wie die Tafeln zeigen, können Sensitivität und Spezifität der singulären Proben als gut bewertet werden; dennoch ist die Errechnung des Mittelwerts in jedem Fall repräsentativer als ein einzelner Wert, da gerade bei den geringen Volumenmengen von 5 µl bzw. 10 µl, mit denen der Assay arbeitet, bei manuellem und nicht maschinellm Pipettieren Volumenvarianzen auftreten können. Ein guter Kompromiss wäre daher der vorläufige Auftrag in Duplikaten, wobei in der vorliegenden Studie alle Werte zur Sensitivität und Spezifität einen Wert von 92,5 % überschritten haben. Die ROC-Kurve (Abb. 83) mit einer AUC von 0,98 qualifiziert den Assay als einen guten Klassifikator.

Damit steht der Assay in der Tradition früherer Bioassays mit CHO Zellen: So konnten schon Vitti, Elisei *et al.* in ihrer Arbeit im Vergleich mit der FRTL-5-Zelllinie zeigen, dass die mit einem humanen TSH-R transfektierten CHO Zellen (JP09) 94 % der unbehandelten MB-Patienten im Assay detektierten (Vitti, Elisei *et al.* 1993), was durch die ebenfalls vergleichende Publikation von Kim, Faiman *et al.* durch Nachweis einer Sensitivität von 92,2 % bestätigt werden konnte (Kim, Faiman *et al.* 1997). Insbesondere das Thyretain® TSI Bioassay präsentierte eine hohe Sensitivität (97,0 %) und Spezifität (95,9 %), sodass das GS Assay dem etablierten Bioassay nur in wenigen Prozentpunkten nachsteht (Lee, Jang *et al.* 2011).

### **5.5 Klinischer Gebrauch und Assay-Evaluation**

Zahlreiche Arbeiten in der Vergangenheit haben den Weg für Bioassays geebnet, die sich nicht mehr durch eine langwierige, sperrige und fehleranfällige Durchführung charakterisieren lassen, sondern sich, wie bereits obig erläutert, durch ein einfaches Protokoll und hohe Sensitivität auszeichnen. Nicht nur wurde der TSH-R erfolgreich transfektiert (Tahara, Ban *et al.* 1991), insgesamt konnte auf radioaktives Material



verzichtet (Watson, Ajjan et al. 1998), Zellen auf Vorrat eingefroren (Takano, Sumizaki et al. 1997) und Proben ohne IgG-Extraktion verwandt werden (vgl. Kapitel 5.2.2).

Doch nicht nur diese Merkmale treffen auf das GS Assay zu: Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Zellpräparation dank der wegfallenden Zellwachstumszeit ohne Sterilbank in einer üblichen Laborräumlichkeit durchgeführt werden kann. Dies besitzt nicht nur den Vorteil einer einfacheren Durchführung, sondern vermeidet auch die Gefahr einer möglichen Kontamination der Zellen. Zudem konnte das Proben- sowie Suspensionsvolumen auf 10 µl und in den Versuchsreihen zur Standardisierung und zur Sensitivität und Spezifität auf 5 µl gesenkt werden, was zur Kosten- und Materialreduktion beiträgt. Die Ergebnisse in Kapitel 4.2.6 rechtfertigen zudem den Verzicht auf einen CO<sub>2</sub>-Inkubator, der dazu beitragen würde, den Assay auch in kleineren Laboratorien ohne Inkubationsmöglichkeit etablieren zu können, da unter RT ebenfalls suffiziente Lichtsignale erreicht werden konnten, sogar nach nur 35 min Inkubationszeit, wie die Resultate der Kapitel 4.3 und 4.4 zeigen, die nach Versuchsansatz IX durchgeführt wurden.

Dank dieser Optimierungen wird die sogenannte Hands-on-Time, also die Zeit, die benötigt wird, um die manuellen Arbeitsschritte durchzuführen, zusammen mit der Zeit für die Inkubation auf circa 2 h (bis Versuchsansatz VIII) bzw. auf circa 1,5 h (Versuchsansatz IX, nach 60 min Inkubationszeit einmalige Messung) geschätzt. Damit übertrifft der Assay alle in Kapitel 5.2.1 aufgeführten Beispiele in der Literatur in Bezug auf die Schnelligkeit der Durchführung.

Als weiterer Vorteil vor allem im Vergleich mit dem Thyretain® TSI Bioassay stellte sich der Wegfall der Probenverdünnung heraus, was neben der verlassenen Zellwachstumszeit zu einem großen Anteil zur Zeitersparnis beitrug. Außerdem sind Waschschrte nicht mehr nötig und eine weitaus höhere Anzahl an Proben kann auf einer Platte gemessen werden, von denen zusätzlich ein geringeres Serumvolumen benötigt wird. Insgesamt ist das Protokoll als benutzerfreundlich zu bewerten.

Nicht zuletzt sollen die hohen Werte der Sensitivität und Spezifität und auch der Reproduzierbarkeit erwähnt werden, die durch die hohe Anzahl der getesteten Proben als repräsentativ anzusehen sind. Die Cut-off-Findung bei einem Wert von 0,08 IU/L gestaltete sich problemlos.

Dennoch gibt es einige Aspekte, die in der Zukunft noch genauer untersucht und eventuell optimiert werden sollten.

So hat die Testung mit nach dem Thyretain® TSI Bioassay in niedrig, moderat und hochpositiv eingeteilten Patientenproben gezeigt, dass die Differenzierung insbesondere zwischen niedrig und moderat positiven Patientenseren im Assay noch nicht eindeutig ist, was im Thyretain® TSI Bioassay jedoch in dieser Form nicht auftritt. Diese Beobachtung konnte unter verschiedenen Zellwachstums- und Inkubationszeiten gemacht werden. Die Unterscheidung von negativ und positiv dagegen ist durch die Sensitivitäts- und Spezifitätsstudie in Kapitel 4.4 als gut zu bewerten. Als noch ausstehend ist auch die Frage nach der Anzahl der Replikate zu berücksichtigen, da die Vier-Felder-Tafeln aus Kapitel 4.4 ähnliche Prozentsätze für Sensitivität und Spezifität angeben und bedacht werden muss, dass in der routinemäßigen Verwendung eine höhere Anzahl an Patientenseren auf einer Platte wünschenswert wäre. Auch der Messzeitpunkt sollte noch einmal evaluiert werden: In den anfänglichen Versuchen nach ON-Inkubation zeigten 30 und 40 min die höchsten RLU-Werte, doch letztendlich, nach Wegfall der Zellwachstumszeit, boten sich 90 min bei RT an. Aber auch nach 60 min wie zur Standardisierung und in der Sensitivitäts- und Spezifitätsstudie konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Die Festsetzung eines definierten Messzeitpunkts sollte daher angegangen werden. Als letzter Punkt ist zu bemerken, dass der bisher verwandte Anteil von 6 % des cAMP Reagenz in RB nicht variiert wurde und daher keine Aussage getroffen werden kann, inwieweit sich die Leistungsfähigkeit des Assays durch Anpassung dieses Parameters verändern würde.

Obwohl eine hohe Anzahl an euthyreoten Kontrollen und Patientenseren im Assay getestet wurde, bleiben natürlich noch einige klinische Fragen offen: Wie verhalten sich die Patientenseren in der Verlaufskontrolle der Erkrankung? Inwiefern verändern sich die TSI-Konzentrationen unter Thyreostatika-Behandlung? Eignet sich der Assay zur Vorhersage von Remission und Rezidiv? Diesen und weiteren Fragestellungen sollte in der Zukunft dieses neuartigen und laut den erzielten Ergebnissen vielversprechenden cAMP-Assays nachgegangen werden, damit es seiner Rolle als schnellere und praktikablere Alternative zu bisherigen Bioassays gerecht werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Nach einer Zeit der intensiven Forschung mit humanem Material und diversen Zelllinien erwies sich der cAMP-Signalweg nach Stimulation durch Autoantikörper am TSH-Rezeptor der thyroidalen Zellen in Morbus-Basedow-Patienten als wertvoller diagnostischer Ansatz. Ein Meilenstein in der Entwicklung von Bioassays, die im Gegensatz zu Bindungs-Immunoassays zwischen stimulierenden und blockierenden Antikörpern am Rezeptor unterscheiden können, war die Transfektion von Ovarzellen des chinesischen Hamsters mit dem TSH-R, um die Konzentration der pathologischen Antikörper in Patientenseren zu quantifizieren.

Ziel dieser Dissertation war es, einen neuartigen cAMP-Bioassay vorzustellen, der sich durch eine unkomplizierte Durchführung auszeichnet. Als Grundlage dienten mit einem Plasmid als Biosensor transfektierte CHO Zellen. Im Laufe der Arbeit wurden Anpassungen der verschiedenen Optimierungsschritte unternommen und evaluiert, um die Höhe, Reproduzierbarkeit und Differenzierung der Lichtsignale nach Stimulation mit monoklonalen Antikörpern und im Anschluss mit Patientenseren von MB-Patienten zu verbessern.

Dafür wurden zunächst Dosis-Wirkungskurven nach spezifischer Stimulation mit dem monoklonalen stimulierenden Antikörper M22 erstellt, die auf eine hohe Sensitivität des Assay schon für geringe Konzentrationen des Antikörpers hindeuteten. Ebenso verhielt es sich mit Mischkonzentrationen von M22 mit dem monoklonalen blockierenden Antikörper K1-70, sodass mit sinkendem Anteil von K1-70 das Lichtsignal im Assay in entsprechendem Maße anstieg, wie es zu erwarten gewesen war.

Bei der Testung mit euthyreoten Normalkontrollen und Patientenseren, die entsprechend des etablierten Thyretain® TSI Bioassays in niedrig, moderat und hochpositive Gruppen klassifiziert wurden, erwies sich der Assay auch bei Reduktion der Zellwachstums- und Inkubationszeit als leistungsfähig und zeigte insgesamt eine gute Vergleichbarkeit zum genannten Bioassay. Daher konnte eine Standardisierung anhand des von der WHO bereitgestellten internationalen Standards 08/204 durchgeführt werden, im Rahmen derer Kontrollen, Normalseren und Patientenseren in internationale Einheiten pro Liter umgerechnet werden konnten und es war möglich, einen linearen Bereich von 0,01 bis 12,1 IU/L zu definieren, der den Großteil der Patientenproben einschloss. Der Assay erreichte bei der anschließenden Testung von

226 positiven und 176 negativen Proben, die zuvor anhand eines Immunoassays klassifiziert worden waren, sehr hohe Werte für Sensitivität und Spezifität.

Die Entwicklung des Assays hin zu einer maximalen Bearbeitungszeit von 1,5 bis 2 h ohne Notwendigkeit einer sterilen Arbeitsfläche und eines Inkubators und mit einem simplen, wenig fehleranfälligen Protokoll empfiehlt ihn als ernstzunehmende Alternative in der klinischen Routine endokrinologischer Labore. Auch wenn die Störanfälligkeit in der Patiententestung noch ein wenig höher ist als in der Testung von monoklonalen Antikörpern, die Differenzierbarkeit von niedrig und moderat positiven Proben noch optimiert und die klinische Aussagekraft noch genauer überprüft werden muss, stellt der Assay nicht zuletzt durch seine einfache Handhabung einen bedeutenden Fortschritt in der Bioassay-Entwicklung zur Detektion von TSI dar.

## 7 Literaturverzeichnis

Smith, T., Hegedüs, L. (2014). „Autoimmune endocrine disease.“ In: Harris P, Bouloux P, Hrsg. *Endocrinology in Clinical Practice*. Boca Raton: CRC Press **265f**.

Adams, D. D. (1958). "The presence of an abnormal thyroid-stimulating hormone in the serum of some thyrotoxic patients." J Clin Endocrinol Metab **18**(7): 699-712.

Allelein, S., T. Diana, M. Ehlers, M. Kanitz, D. Hermsen, M. Schott and G. J. Kahaly (2019). "Comparison of a Bridge Immunoassay with Two Bioassays for Thyrotropin Receptor Antibody Detection and Differentiation." Horm Metab Res **51**(6): 341-346.

Ambesi-Impiombato, F. S., L. A. Parks and H. G. Coon (1980). "Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(6): 3455-3459.

Araki, N., M. Iida, N. Amino, S. Morita, A. Ide, E. Nishihara, M. Ito, J. Saito, T. Nishikawa, K. Katsuragi and A. Miyauchi (2015). "Rapid bioassay for detection of thyroid-stimulating antibodies using cyclic adenosine monophosphate-gated calcium channel and aequorin." Eur Thyroid J **4**(1): 14-19.

Arikawa, K., Y. Ichikawa, T. Yoshida, T. Shinozawa, M. Homma, N. Momotani and K. Ito (1985). "Blocking type antithyrotropin receptor antibody in patients with nongoitrous hypothyroidism: its incidence and characteristics of action." J Clin Endocrinol Metab **60**(5): 953-959.

Bahn, R. S., C. M. Dutton, N. Natt, W. Joba, C. Spitzweg and A. E. Heufelder (1998). "Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy." J Clin Endocrinol Metab **83**(3): 998-1002.

Bartalena, L. and V. Fatourechi (2014). "Extrathyroidal manifestations of Graves' disease: a 2014 update." J Endocrinol Invest **37**(8): 691-700.

Binkowski, B. F., B. L. Butler, P. F. Stecha, C. T. Eggers, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, M. G. Wood, L. P. Encell, F. Fan and K. V. Wood (2011). "A luminescent biosensor with increased dynamic range for intracellular cAMP." ACS Chem Biol **6**(11): 1193-1197.

Botero, D. and R. S. Brown (1998). "Bioassay of thyrotropin receptor antibodies with Chinese hamster ovary cells transfected with recombinant human thyrotropin receptor: clinical utility in children and adolescents with Graves disease." J Pediatr **132**(4): 612-618.

Brown, J., J. Ensor and D. S. Munro (1968). "A comparison of the actions of thyroid-stimulating hormone and the long-acting thyroid stimulator in an in vitro assay." Proc R Soc Med **61**(7): 652-654.

Bryson, J. M., A. Joasoo and J. R. Turtle (1976). "The thyrotrophin receptor in human thyroid plasma membranes: effect of serum immunoglobulins." Acta Endocrinol (Copenh) **83**(3): 528-538.

Burke, G. (1968). "The long-acting thyroid stimulator of Graves' disease." Am J Med **45**(3): 435-450.

Chiovato, L., P. Vitti, A. Lombardi, G. Lopez, F. Santini, E. Macchia, G. F. Fenzi, C. Mammoli, S. Battiato and A. Pinchera (1987). "Detection and characterization of autoantibodies blocking the TSH-dependent cAMP production using FRTL-5 cells." J Endocrinol Invest **10**(4): 383-388.

de Wet, J. R., K. V. Wood, D. R. Helinski and M. DeLuca (1985). "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7870-7873.

Diana, T., R. S. Brown, A. Bossowski, M. Segni, M. Niedziela, J. Konig, A. Bossowska, K. Ziora, A. Hale, J. Smith, S. Pitz, M. Kanitz and G. J. Kahaly (2014). "Clinical relevance of thyroid-stimulating autoantibodies in pediatric graves' disease-a multicenter study." J Clin Endocrinol Metab **99**(5): 1648-1655.

Diana, T. and G. J. Kahaly (2018). "Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies in Thyroid Eye Disease-Methodology and Clinical Applications." Ophthalmic Plast Reconstr Surg **34**(4S Suppl 1): S13-s19.

Diana, T., M. Kanitz, M. Lehmann, Y. Li, P. D. Olivo and G. J. Kahaly (2015). "Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies." Thyroid **25**(2): 169-175.

Diana, T., J. Krause, P. D. Olivo, J. Konig, M. Kanitz, B. Decallonne and G. J. Kahaly (2017). "Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease." Clin Exp Immunol **189**(3): 304-309.

Diana, T., Y. Li, P. D. Olivo, K. J. Lackner, H. Kim, M. Kanitz and G. J. Kahaly (2016). "Analytical Performance and Validation of a Bioassay for Thyroid-Blocking Antibodies." Thyroid **26**(5): 734-740.

Diana, T., P. D. Olivo, Y.-H. Chang, C. Wüster, M. Kanitz and G. J. Kahaly (2019). "Comparison of a Novel Homogeneous Cyclic Amp Assay and a Luciferase Assay for Measuring Stimulating Thyrotropin-Receptor Autoantibodies." Eur Thyroid J **9**: 67-72.

Diana, T., P. D. Olivo and G. J. Kahaly (2018). "Thyrotropin Receptor Blocking Antibodies." Horm Metab Res **50**(12): 853-862.

Diana, T., K. A. Ponto and G. J. Kahaly (2020). "Thyrotropin receptor antibodies and Graves' orbitopathy." J Endocrinol Invest.

Diana, T., C. Wuster, M. Kanitz and G. J. Kahaly (2016). "Highly variable sensitivity of five binding and two bio-assays for TSH-receptor antibodies." J Endocrinol Invest **39**(10): 1159-1165.

Diana, T., C. Wuster, P. D. Olivo, A. Unterrainer, J. Konig, M. Kanitz, A. Bossowski, B. Decallonne and G. J. Kahaly (2017). "Performance and Specificity of 6 Immunoassays for TSH Receptor Antibodies: A Multicenter Study." Eur Thyroid J **6**(5): 243-249.

Dorrington, K. J., L. Carneiro and D. S. Munro (1966). "The proteolysis of immunoglobulin G with long-acting thyroid-stimulating activity." Biochem J **98**(3): 858-861.

Dupriez, V. J., K. Maes, E. Le Poul, E. Burgeon and M. Detheux (2002). "Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors." Receptors Channels **8**(5-6): 319-330.

Ealey, P. A., S. D. Mitchell, P. M. Rowles and N. J. Marshall (1988). "An improved metaphase index assay for detecting thyroid growth stimulators using FRTL-5 thyroid cells cultured on a microtitre plate." J Immunol Methods **111**(1): 117-123.

Eckstein, A., K. Mann, G. J. Kahaly, M. Grussendorf, C. Reiners, J. Feldkamp, B. Quadbeck, A. Bockisch and M. Schott (2009). "[Role of TSH receptor autoantibodies for the diagnosis of Graves' disease and for the prediction of the course of hyperthyroidism and ophthalmopathy. Recommendations of the Thyroid Section of the German Society of Endocrinology]." Med Klin (Munich) **104**(5): 343-348.

Eckstein, A. K., M. Plicht, H. Lax, M. Neuhauser, K. Mann, S. Lederbogen, C. Heckmann, J. Esser and N. G. Morgenthaler (2006). "Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease." J Clin Endocrinol Metab **91**(9): 3464-3470.

El Fassi, D., J. P. Banga, J. A. Gilbert, C. Padoa, L. Hegedus and C. H. Nielsen (2009). "Treatment of Graves' disease with rituximab specifically reduces the production of thyroid stimulating autoantibodies." Clin Immunol **130**(3): 252-258.

Evans, C., N. G. Morgenthaler, S. Lee, D. H. Llewellyn, R. Clifton-Bligh, R. John, J. H. Lazarus, V. K. Chatterjee and M. Ludgate (1999). "Development of a luminescent bioassay for thyroid stimulating antibodies." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 374-377.

Evans, M., J. Sanders, T. Tagami, P. Sanders, S. Young, E. Roberts, J. Wilmot, X. Hu, K. Kabelis, J. Clark, S. Holl, T. Richards, A. Collyer, J. Furmaniak and B. R. Smith (2010). "Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample." Clin Endocrinol (Oxf) **73**(3): 404-412.

Frank, C. U., S. Braeth, J. W. Dietrich, D. Wanjura and U. Loos (2015). "Bridge Technology with TSH Receptor Chimera for Sensitive Direct Detection of TSH Receptor Antibodies Causing Graves' Disease: Analytical and Clinical Evaluation." Horm Metab Res **47**(12): 880-888.

Furmaniak, J., J. Sanders, S. Young, K. Kabelis, P. Sanders, M. Evans, J. Clark, J. Wilmot and B. Rees Smith (2012). "In vivo effects of a human thyroid-stimulating monoclonal autoantibody (M22) and a human thyroid-blocking autoantibody (K1-70)." Auto Immun Highlights **3**(1): 19-25.

Giuliani, C., D. Cerrone, N. Harii, M. Thornton, L. D. Kohn, N. M. Dagia, I. Bucci, M. Carpentieri, B. Di Nenno, A. Di Blasio, P. Vitti, F. Monaco and G. Napolitano (2012). "A TSHR-LH/CGR chimera that measures functional thyroid-stimulating autoantibodies (TSAb) can predict remission or recurrence in Graves' patients undergoing antithyroid drug (ATD) treatment." J Clin Endocrinol Metab **97**(7): E1080-1087.

Giuliani, C., D. Cerrone, N. Harii, M. Thornton, L. D. Kohn, N. M. Dagia, E. Fiore, I. Bucci, T. Chamblin, P. Vitti, F. Monaco and G. Napolitano (2012). "A TSHr-LH/CGr chimera that measures functional TSAb in Graves' disease." J Clin Endocrinol Metab **97**(7): E1106-1115.

Grasso, Y. Z., M. R. Kim, C. Faiman, L. D. Kohn, K. Tahara and M. K. Gupta (1999). "Epitope heterogeneity of thyrotropin receptor-blocking antibodies in Graves' patients as detected with wild-type versus chimeric thyrotropin receptors." Thyroid **9**(6): 531-537.

Hai, Y. P., A. C. H. Lee, L. Frommer, T. Diana and G. J. Kahaly (2020). "Immunohistochemical analysis of human orbital tissue in Graves' orbitopathy." J Endocrinol Invest **43**(2): 123-137.

Himmler, A., C. Stratowa and A. P. Czernilofsky (1993). "Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines." J Recept Res **13**(1-4): 79-94.

Hovens, G. C., A. M. Buiting, M. Karperien, B. E. Ballieux, G. van der Pluijm, A. M. Pereira, J. A. Romijn and J. W. Smit (2006). "A bioluminescence assay for thyrotropin receptor antibodies predicts serum thyroid hormone levels in patients with de novo Graves' disease." Clin Endocrinol (Oxf) **64**(4): 429-435.

Jordan, N. J., C. Rinderle, J. Ashfield, N. G. Morgenthaler, J. Lazarus, M. Ludgate and C. Evans (2001). "A luminescent bioassay for thyroid blocking antibodies." Clin Endocrinol (Oxf) **54**(3): 355-364.

Kahaly, G. J., L. Bartalena, L. Hegedus, L. Leenhardt, K. Poppe and S. H. Pearce (2018). "2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism." Eur Thyroid J **7**(4): 167-186.

Kahaly, G. J. and T. Diana (2017). "TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature." Front Endocrinol (Lausanne) **8**: 28.

Kahaly, G. J., T. Diana, J. Glang, M. Kanitz, S. Pitz and J. König (2016). "Thyroid Stimulating Antibodies Are Highly Prevalent in Hashimoto's Thyroiditis and Associated Orbitopathy." J Clin Endocrinol Metab **101**(5): 1998-2004.

Kahaly, G. J., T. Diana, M. Kanitz, L. Frommer and P. D. Olivo (2020). "Prospective Trial of Functional Thyrotropin Receptor Antibodies in Graves Disease." J Clin Endocrinol Metab **105**(4).

Kahaly, G. J., T. Diana and P. D. Olivo (2020). "TSH RECEPTOR ANTIBODIES: RELEVANCE & UTILITY." Endocr Pract **26**(1): 97-106.



Kahaly, G. J., C. Wuster, P. D. Olivo and T. Diana (2019). "High Titers of Thyrotropin Receptor Antibodies Are Associated With Orbitopathy in Patients With Graves Disease." J Clin Endocrinol Metab **104**(7): 2561-2568.

Kamijo, K., H. Murayama, T. Uzu, K. Togashi and G. J. Kahaly (2010). "A novel bioreporter assay for thyrotropin receptor antibodies using a chimeric thyrotropin receptor (mc4) is more useful in differentiation of Graves' disease from painless thyroiditis than conventional thyrotropin-stimulating antibody assay using porcine thyroid cells." Thyroid **20**(8): 851-856.

Kamijo, K., H. Murayama, T. Uzu, K. Togashi, P. D. Olivo and G. J. Kahaly (2011). "Similar clinical performance of a novel chimeric thyroid-stimulating hormone receptor bioassay and an automated thyroid-stimulating hormone receptor binding assay in Graves' disease." Thyroid **21**(12): 1295-1299.

Kamijo, K., A. Nagata and Y. Sato (1999). "Clinical significance of a sensitive assay for thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease using polyethylene glycol at high concentrations and porcine thyroid cells." Endocr J **46**(3): 397-403.

Kampmann, E., T. Diana, M. Kanitz, D. Hoppe and G. J. Kahaly (2015). "Thyroid Stimulating but Not Blocking Autoantibodies Are Highly Prevalent in Severe and Active Thyroid-Associated Orbitopathy: A Prospective Study." Int J Endocrinol **2015**: 678194.

Kasagi, K., J. Konishi, Y. Iida, K. Ikekubo, T. Mori, K. Kuma and K. Torizuka (1982). "A new in vitro assay for human thyroid stimulator using cultured thyroid cells: effect of sodium chloride on adenosine 3',5'-monophosphate increase." J Clin Endocrinol Metab **54**(1): 108-114.

Kim, M. R., C. Faiman, B. J. Hoogwerf and M. K. Gupta (1997). "Thyroid-stimulating antibody assay using a human thyrotropin receptor transfected cell line: relationship to clinical features of graves' disease." Endocr Pract **3**(6): 337-343.

Kriss, J. P., V. Pleshakov and J. R. Chien (1964). "ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE LONG-ACTING THYROID STIMULATOR AND ITS RELATION TO HYPERTHYROIDISM AND CIRCUMSCRIBED PRETIBIAL MYXEDEMA." J Clin Endocrinol Metab **24**: 1005-1028.

Latif, R., A. Teixeira, K. Michalek, M. R. Ali, M. Schlesinger, R. Baliram, S. A. Morshed and T. F. Davies (2012). "Antibody protection reveals extended epitopes on the human TSH receptor." PLoS One **7**(9): e44669.

Lee, J. I., H. W. Jang, S. K. Kim, J. Y. Choi, J. Y. Kim, K. Y. Hur, J. H. Kim, Y. K. Min, J. H. Chung and S. W. Kim (2011). "Diagnostic value of a chimeric TSH receptor (Mc4)-based bioassay for Graves' disease." Korean J Intern Med **26**(2): 179-186.

Leschik, J. J., T. Diana, P. D. Olivo, J. Konig, U. Krahn, Y. Li, M. Kanitz and G. J. Kahaly (2013). "Analytical performance and clinical utility of a bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins." Am J Clin Pathol **139**(2): 192-200.

Li, Y., J. Kim, T. Diana, R. Klasen, P. D. Olivo and G. J. Kahaly (2013). "A novel bioassay for anti-thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid-blocking and stimulating activity." Clin Exp Immunol **173**(3): 390-397.

Loosfelt, H., C. Pichon, A. Jolivet, M. Misrahi, B. Caillou, M. Jamous, B. Vannier and E. Milgrom (1992). "Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 3765-3769.

Ludgate, M., J. Perret, M. Parmentier, C. Gerard, F. Libert, J. E. Dumont and G. Vassart (1990). "Use of the recombinant human thyrotropin receptor (TSH-R) expressed in mammalian cell lines to assay TSH-R autoantibodies." Mol Cell Endocrinol **73**(1): R13-18.

Lytton, S. D. and G. J. Kahaly (2010). "Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update." Autoimmun Rev **10**(2): 116-122.

Lytton, S. D., Y. Li, P. D. Olivo, L. D. Kohn and G. J. Kahaly (2010). "Novel chimeric thyroid-stimulating hormone-receptor bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins." Clin Exp Immunol **162**(3): 438-446.

Lytton, S. D., K. A. Ponto, M. Kanitz, N. Matheis, L. D. Kohn and G. J. Kahaly (2010). "A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy." J Clin Endocrinol Metab **95**(5): 2123-2131.

McKenzie, J. M. (1958). "The bioassay of thyrotropin in serum." Endocrinology **63**(3): 372-382.

McLachlan, S. M. and B. Rapoport (2013). "Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa." Thyroid **23**(1): 14-24.

Michalek, K., S. A. Morshed, R. Latif and T. F. Davies (2009). "TSH receptor autoantibodies." Autoimmun Rev **9**(2): 113-116.

Michelangeli, V. P., D. S. Munro, C. W. Poon, A. G. Frauman and P. G. Colman (1994). "Measurement of thyroid stimulating immunoglobulins in a new cell line transfected with a functional human TSH receptor (JPO9 cells), compared with an assay using FRTL-5 cells." Clin Endocrinol (Oxf) **40**(5): 645-652.

Minich, W. B., C. Lenzner, A. Bergmann and N. G. Morgenthaler (2004). "A coated tube assay for the detection of blocking thyrotropin receptor autoantibodies." J Clin Endocrinol Metab **89**(1): 352-356.

Morgenthaler, N. G., I. Pampel, G. Aust, J. Seissler and W. A. Scherbaum (1998). "Application of a bioassay with CHO cells for the routine detection of stimulating and blocking autoantibodies to the TSH-receptor." Horm Metab Res **30**(3): 162-168.

Morshed, S. A., T. Ando, R. Latif and T. F. Davies (2010). "Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades." Endocrinology **151**(11): 5537-5549.

Morshed, S. A. and T. F. Davies (2015). "Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies." Horm Metab Res **47**(10): 727-734.

Morshed, S. A., R. Ma, R. Latif and T. F. Davies (2013). "How one TSH receptor antibody induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis." J Autoimmun **47**: 17-24.

Onaya, T., M. Kotani, T. Yamada and Y. Ochi (1973). "New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices." J Clin Endocrinol Metab **36**(5): 859-866.

Parmentier, M., F. Libert, C. Maenhaut, A. Lefort, C. Gerard, J. Perret, J. Van Sande, J. E. Dumont and G. Vassart (1989). "Molecular cloning of the thyrotropin receptor." Science **246**(4937): 1620-1622.

Perret, J., M. Ludgate, F. Libert, C. Gerard, J. E. Dumont, G. Vassart and M. Parmentier (1990). "Stable expression of the human TSH receptor in CHO cells and characterization of differentially expressing clones." Biochem Biophys Res Commun **171**(3): 1044-1050.

Planells, R., G. Fayet, S. Lissitzky, G. Hennen and J. Closset (1975). "Bioassay of thyrotropin using isolated porcine thyroid cells." FEBS Lett **53**(1): 87-91.

Ponto, K. A., H. Binder, T. Diana, N. Matheis, A. F. Otto, S. Pitz, N. Pfeiffer and G. J. Kahaly (2015). "Prevalence, Phenotype, and Psychosocial Well-Being in Euthyroid/Hypothyroid Thyroid-Associated Orbitopathy." Thyroid **25**(8): 942-948.

Ponto, K. A., M. Kanitz, P. D. Olivo, S. Pitz, N. Pfeiffer and G. J. Kahaly (2011). "Clinical relevance of thyroid-stimulating immunoglobulins in graves' ophthalmopathy." Ophthalmology **118**(11): 2279-2285.

Ponto, K. A., D. Schuppan, I. Zwiener, H. Binder, A. Mirshahi, T. Diana, S. Pitz, N. Pfeiffer and G. J. Kahaly (2014). "Thyroid-associated orbitopathy is linked to gastrointestinal autoimmunity." Clin Exp Immunol **178**(1): 57-64.

Purves, H. D. and D. D. Adams (1960). "Thyroid-stimulating hormone." Br Med Bull **16**: 128-132.

Rapoport, B., S. Filetti, N. Takai, P. Seto and G. Halverson (1982). "Studies on the cyclic AMP response to thyroid stimulating immunoglobulin (TSI) and thyrotropin (TSH) in human thyroid cell monolayers." Metabolism **31**(11): 1159-1167.

Rees Smith, B., S. M. McLachlan and J. Furmaniak (1988). "Autoantibodies to the thyrotropin receptor." Endocr Rev **9**(1): 106-121.

Sanders, J., M. Evans, L. D. Premawardhana, H. Depraetere, J. Jeffrey, T. Richards, J. Furmaniak and B. Rees Smith (2003). "Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody." Lancet **362**(9378): 126-128.

Schott, M., W. B. Minich, H. S. Willenberg, C. Papewalis, J. Seissler, J. Feldkamp, A. Bergmann, W. A. Scherbaum and N. G. Morgenthaler (2005). "Relevance of TSH receptor stimulating and blocking autoantibody measurement for the prediction of relapse in Graves' disease." Horm Metab Res **37**(12): 741-744.

Smith, B. R., J. Bolton, S. Young, A. Collyer, A. Weeden, J. Bradbury, D. Weightman, P. Perros, J. Sanders and J. Furmaniak (2004). "A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies." Thyroid **14**(10): 830-835.

Smith, B. R. and R. Hall (1974). "Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease." Lancet **2**(7878): 427-431.

Tahara, K., T. Ban, T. Minegishi and L. D. Kohn (1991). "Immunoglobulins from Graves' disease patients interact with different sites on TSH receptor/LH-CG receptor chimeras than either TSH or immunoglobulins from idiopathic myxedema patients." Biochem Biophys Res Commun **179**(1): 70-77.

Tahara, K., N. Ishikawa, K. Yamamoto, A. Hirai, K. Ito, Y. Tamura, S. Yoshida, Y. Saito and L. D. Kohn (1997). "Epitopes for thyroid stimulating and blocking autoantibodies on the extracellular domain of the human thyrotropin receptor." Thyroid **7**(6): 867-877.

Takano, T., H. Sumizaki and N. Amino (1997). "Detection of thyroid-stimulating antibody using frozen stocks of Chinese hamster ovary cells transfected with cloned human thyrotropin receptor." Endocr J **44**(3): 431-435.

Teng, C. S., B. R. Smith, J. Anderson and R. Hall (1975). "Comparison of thyrotrophin receptors in membranes prepared from fat and thyroid tissue." Biochem Biophys Res Commun **66**(2): 836-841.

Tian, L., R. E. Wang, Y. Fei and Y. H. Chang (2012). "A homogeneous fluorescent assay for cAMP-phosphodiesterase enzyme activity." J Biomol Screen **17**(3): 409-414.

Vitti, P., L. Chiovato, G. Lopez, A. Lombardi, F. Santini, C. Mammoli, P. Bassi, M. Gryczynska, E. Schipani, M. Tosti-Balducci and et al. (1988). "Measurement of TSAb directly in serum using FRTL-5 cells." J Endocrinol Invest **11**(4): 313-317.

Vitti, P., R. Elisei, M. Tonacchera, L. Chiovato, F. Mancusi, T. Rago, C. Mammoli, M. Ludgate, G. Vassart and A. Pinchera (1993). "Detection of thyroid-stimulating antibody using Chinese hamster ovary cells transfected with cloned human thyrotropin receptor." J Clin Endocrinol Metab **76**(2): 499-503.

Vitti, P., C. M. Rotella, W. A. Valente, J. Cohen, S. M. Aloj, P. Laccetti, F. S. Ambesi-Impiombato, E. F. Grollman, A. Pinchera, R. Toccafondi and L. D. Kohn (1983). "Characterization of the optimal stimulatory effects of graves' monoclonal and serum immunoglobulin G on adenosine 3',5'-monophosphate production in fRTL-5 thyroid cells: a potential clinical assay." J Clin Endocrinol Metab **57**(4): 782-791.

Wallaschofski, H. and R. Paschke (1999). "Detection of thyroid stimulating (TSAB)- and thyrotropin stimulation blocking (TSBAB) antibodies with CHO cell lines expressing different TSH-receptor numbers." Clin Endocrinol (Oxf) **50**(3): 365-372.

Watson, P. F., R. A. Ajjan, J. Phipps, R. Metcalfe and A. P. Weetman (1998). "A new chemiluminescent assay for the rapid detection of thyroid stimulating antibodies in Graves' disease." Clin Endocrinol (Oxf) **49**(5): 577-581.

Zophel, K., D. Roggenbuck and M. Schott (2010). "Clinical review about TRAb assay's history." Autoimmun Rev **9**(10): 695-700.

## **8 Danksagung**

## **9 Tabellarischer Lebenslauf**

